



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Institut National Polytechnique de Toulouse  
Discipline ou spécialité : Science et Génie des Matériaux

---

Présentée et soutenue par Simona Andreia JACOTA POPESCU  
le 14 novembre 2008

### FILMS MINCES DE DIOXYDE DE TITANE DÉPOSÉS SUR TITANE PAR MOCVD : MICROSTRUCTURE ET BIOCOMPATIBILITÉ

---

#### JURY

Francis MAURY	Directeur de Recherche CNRS, Toulouse	Président
Marioara ABRUDEANU	Professeur, Université de Pitesti, Membre correspondant de l'Académie des Sciences de Roumanie	Rapporteur
Pierre LAYROLLE	Directeur de Recherche INSERM, Nantes	Rapporteur
Alain N. GLEIZES	Professeur, Institut National Polytechnique de Toulouse	co-Directeur
Ioana DEMETRESCU	Professeur, Université Polytechnique de Bucarest	co-Directeur
Anisoara CÎMPEAN	Maître de Conférence, Université de Bucarest	Examineur
Brigitte CAUSSAT	Maître de Conférence, Institut National Polytechnique de Toulouse	Examineur

---

**Ecole doctorale :** Sciences de la Matière

**Unités de recherche :** CIRIMAT (INP Toulouse) – Département de Chimie Générale (UP Bucarest)

**Directeurs de Thèse :** Alain N. GLEIZES (INP Toulouse) - Ioana DEMETRESCU (UP Bucarest)

## ***Glossa***

*„Le temps passe, le temps vient  
Tout est ancien, tout est nouveau;  
Ce qui est mal, ce qui est bien  
Pèse et médite à tout propos;  
N'espère pas et n'aie pas peur,  
Ce qui est flot en flot s'en va,  
Si on te mande ou on te leurre.  
A toute chose reste froid.  
D'innombrables choses on voit,  
On en entend sonner beaucoup,  
Qui pourrait retenir cela,  
Et qui pourrait écouter tout? .  
Toi, tu dois t'asseoir d'un côté,  
Te retrouvant dans ton maintien,  
Dans les bruits de la vanité  
Le temps passe, le temps vient...”*

*„Vreme trece, vreme vine,  
Toate-s vechi si noua toate,  
Ce e rau si ce e bine  
Tu te-ntreaba si socoate;  
Nu spera si nu ai teama,  
Ce e val ca valul trece;  
De te-ndeamna, de te cheama,  
Tu ramai la toate rece.  
Multe trec pe dinainte,  
In auz ne suna multe,  
Cine tine toate minte  
Si ar sta sa le asculte?...  
Tu aseaza-te deoparte,  
Regasindu-te pe tine,  
Cand cu zgomote desarte  
Vreme trece, vreme vine...”*

M. Eminescu

*A mes parents et à Ionut, avec toute ma reconnaissance*

## Remerciements

Cette thèse s'est déroulée sous la cotutelle de l'Institut National Polytechnique de Toulouse et de l'Université Polytechnique de Bucharest.

J'exprime ma plus grande reconnaissance à mon directeur de thèse, Monsieur Alain Gleizes, Professeur à l'INP de Toulouse et co-directeur de la thèse, pour m'avoir donné la chance de réaliser cette thèse en cotutelle. Je tiens à lui exprimer aussi toute ma gratitude pour avoir encadré ce travail pendant ces trois années et pour m'avoir fait profiter de son expérience au travers de tous ses conseils. La grande patience, les encouragements et l'amabilité dont il a fait preuve ont contribué à la finalisation de ce manuscrit.

Je tiens à remercier le Directeur du Centre Interuniversitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux, Monsieur Francis Maury, Directeur de recherche au CNRS, pour l'accueil qu'il m'a réservé dans son Laboratoire, pour son amabilité, pour son analyse critique, toujours constructive, de mon travail, et pour avoir présidé mon Jury de thèse.

Je remercie Monsieur Constantin Vahlas, Directeur de recherche au CNRS, de m'avoir accueillie au sein de son équipe Dépôt Chimique en Phase Vapeur (CVD) et de m'avoir donné des conseils pertinents.

Je remercie tout particulièrement Madame Ioana Demetrescu, Professeur de l'Université Polytechnique de Bucarest, co-directrice de ces travaux, pour ses conseils, ses encouragements, son dynamisme et ses compétences scientifiques qui m'ont permis de mener à bien cette étude.

J'exprime ma reconnaissance à Monsieur Pierre Layrolle, Directeur de Recherche à l'INSERM à Nantes, et à Madame Marioara Abrudeanu, Professeur de l'Université de Pitesti et Membre correspondant de l'Académie des Sciences Techniques de Roumanie, pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, pour la lecture minutieuse de mon manuscrit et leurs nombreux et justes conseils.

J'exprime également ma reconnaissance à Madame Anisoara Cîmpean, Maître de Conférence à la Faculté de Biologie de l'Université de Bucarest, pour son grand soutien et sa compétence dans la réalisation des cultures cellulaires et des tests biologiques et leur interprétation, ainsi que pour sa participation au Jury.

Je tiens à remercier Madame Brigitte Caussat, Maître de Conférence à l'Institut National Polytechnique de Toulouse, d'avoir apporté son point de vue sur la thèse, en participant au Jury.

J'adresse aussi mes remerciements à Monsieur Pierre-Emmanuel Gleizes, Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse, pour son aide dans la rédaction du chapitre consacré aux tests biologiques.

Je remercie sincèrement Diane Samélor, Ingénieur d'Etudes dans l'équipe CVD, pour la gentillesse, l'amitié et les compétences dont elle a fait preuve en me formant sur certaines techniques et également pour le temps passé ensemble chaque jour au laboratoire.

J'adresse aussi mes chaleureux remerciements à l'ensemble du personnel du CIRIMAT avec lesquels j'ai eu l'occasion d'échanger des informations scientifiques mais également culturelles au cours de ces trois années : François Senoq, Anouar Benali, Claire Tendero, Corinne Dufaure, Nathalie Prud'homme, Vlad et Assia Turgambaeva, Sophie Duclos, Florent Seichepine, Bartos Sarapata, Jaïme Puig Pey, Christos Christoglou. Je les remercie de leur gentillesse et de leur soutien lors de mes séjours à Toulouse. Je voudrais souligner plus particulièrement l'apport de mes collègues Dan Duminica et Christos Sarantopoulos qui m'ont initiée à la technique MOCVD. Pas la dernière, mais je voudrais remercier spécialement Virginie Santucci avec laquelle j'ai partagé non seulement le bureau mais aussi des passions communes comme la montagne, l'amour pour la nature et des idées de cuisine novatrices.

Un grand merci à Yannick Thébault, pour les belles photos MEB prises sur les cristaux de  $\text{TiO}_2$ , toujours intéressantes, et pour la formation qu'il m'a donnée sur la technique de caractérisation MEB.

Je souhaite remercier Daniel Sadowski, le Technicien « tout savoir faire » de l'équipe, pour son amabilité, sa disponibilité et sa capacité à trouver des solutions à tous les problèmes, y compris le vélo...

Un petit clin d'œil à mes amis roumains de Toulouse avec lesquels j'ai passé de bons moments pendant nos réunions très animées en ville ou à la montagne.

Ma reconnaissance et ma gratitude vont également à Madame Marie-Françoise Gleizes, pour son hospitalité, son esprit jeune, optimiste et novateur.

Je n'oublie pas mes collègues du Département de Chimie Générale de Bucarest, qui m'ont encouragée pendant toute cette période. Je les remercie sincèrement tous.

J'exprime ma très profonde reconnaissance à mes parents, à mes beaux-parents et à Ionuț, mon époux, qui m'ont toujours comprise, encouragée et ont eu confiance en moi. Je vous remercie de tout mon cœur.

## Sommaire

<b>Introduction Générale.....</b>	<b>9</b>
<b>Chapitre I – Etat de l’art.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1. Les biomatériaux.....</b>	<b>13</b>
1.1.1. Qu'est-ce-qu'un biomatériau ? .....	13
1.1.2. Les différentes classes de biomatériaux.....	14
1.1.2.1. Les biomatériaux métalliques.....	14
1.1.2.2. Les biomatériaux polymères .....	16
1.2.2.3. Les biomatériaux céramiques .....	17
1.2.2.4. Les biomatériaux composites .....	17
1.1.3. Le choix du titane .....	17
1.1.3.1. Les caractéristiques du titane .....	17
1.1.3.2. Le rôle de $\text{TiO}_2$ .....	19
<b>1.2. Biocompatibilité.....</b>	<b>19</b>
1.2.1. Qu'est-ce que la biocompatibilité ?.....	19
1.2.2. Les étapes d'intégration d'un implant .....	21
1.2.3. La problématique des matériaux métalliques implantés dans le corps humain .....	22
1.2.4. Améliorer la biocompatibilité du titane par traitement de surface .....	22
1.2.4.1. Les traitements physiques .....	23
1.2.4.2. Les traitements chimiques .....	24
1.2.4.3. Les traitements biologiques.....	25
1.2.5. Les paramètres de surface qui influencent l'intégration d'un implant .....	25
1.2.5.1. La topographie de surface .....	26
1.2.5.2. La chimie de surface.....	29
<b>1.3. La technique MO-CVD pour fabriquer un biomatériau <math>\text{TiO}_2/\text{Ti}</math>.....</b>	<b>31</b>
1.3.1. Généralités sur les procédés CVD et MO-CVD .....	31
1.3.2. Pourquoi utiliser la technique MOCVD pour déposer du $\text{TiO}_2$ sur du titane ? .....	33
1.3.3. L'objectif de ce travail .....	33
<b>Références .....</b>	<b>37</b>
<b>Chapitre II – Préparation et caractérisation des films de <math>\text{TiO}_2</math> .....</b>	<b>43</b>
<b>2.1. Préparation des films minces de <math>\text{TiO}_2</math> .....</b>	<b>43</b>
2.1.1. Préparation par MOCVD .....	43
2.1.1.1. Le précurseur.....	43
2.1.1.2. Le dispositif expérimental .....	43
2.1.1.3. Protocole expérimental.....	45
2.1.2. Préparation par anodisation du titane.....	46
<b>2.2. Caractérisation physico-chimique des dépôts.....</b>	<b>47</b>
2.2.1. Diffraction des rayons X (DRX).....	47
2.2.2. Microscopie électronique à balayage (MEB) .....	48
2.2.3. Mesure de l'épaisseur des films déposés sur titane .....	48
2.2.3.1. Epaisseur déduite de la prise de masse.....	48
2.2.3.2. Mesure de l'épaisseur par réflectométrie .....	49
2.2.4. Mesure de la rugosité par interférométrie optique.....	50

2.2.5. Mesure de l'énergie de surface par la technique du mouillage .....	50
2.2.6. Mesure du potentiel zêta de surface.....	50
2.2.7. Mesure de l'adhérence par la technique du Scratch test.....	52
2.2.8. Etude de la résistance à la corrosion.....	52
2.2.8.1. Potentiel d'électrode en circuit ouvert (OCP) .....	53
2.2.8.2. Voltamétrie cyclique .....	53
<b>2.3. Caractérisation biologique des dépôts.....</b>	<b>55</b>
2.3.1. Milieux de cultures cellulaires et réactifs .....	55
2.3.2. Caractéristiques des fibroblastes HGF-1.....	55
2.3.3. Caractéristiques des ostéoblastes h-FOB1.19.....	56
2.3.4. Techniques de caractérisation des cellules .....	56
2.3.4.1. Observation des cytomorphologies. ....	56
2.3.4.2. Etude de l'intégrité des membranes cellulaires par le test LDH .....	56
2.3.4.3. Etudes immuno-cytochimiques pour la détection de la fibronectine, des protéines de cytosquelette et de l'antigène Ki 67 par microscopie de fluorescence .....	57
2.3.4.4. Détection de l'actine marquée à la phalloïdine .....	58
2.3.4.5. Analyse de la prolifération cellulaire par la détection de 5'-bromodéoxyuridine incorporé par les cellules.....	58
2.3.4.6. Détermination du niveau d'expression protéique d'antigène de prolifération nucléaire (PCNA) par la technique Western blot.....	58
2.3.4.7. Analyse zymographique pour la mise en évidence de métalloprotéinases matricielles (MMP) avec activité gélatinolytique.....	59
<b>Références .....</b>	<b>59</b>
<b>Chapitre III - Croissance et caractérisation des films de TiO<sub>2</sub>.....</b>	<b>61</b>
<b>3.1. Films de TiO<sub>2</sub> préparés par LP-MOCVD.....</b>	<b>61</b>
3.1.1. Conformité du dépôt de TiO <sub>2</sub> .....	61
3.1.2. Cinétique de croissance des films de TiO <sub>2</sub> .....	62
3.1.2.1. Cinétique de croissance sous 20 torr .....	62
3.1.2.2. Cinétique de croissance sous 1 torr .....	64
3.1.3. Etude de la morphologie des films par microscopie électronique à balayage (MEB) .....	65
3.1.3.1. Morphologie des dépôts élaborés sous 20 torr .....	65
3.1.3.2. Morphologie des dépôts élaborés sous 1 torr .....	69
3.1.4. Etude de la composition allotropique et de la texture par diffraction des rayons X.....	70
3.1.4.1. La texture des dépôts .....	70
3.1.4.2. Influence de la température et de la pression sur la composition allotropique.....	71
3.1.4.3. Influence de la fraction molaire et du poli du substrat sur la composition et la texture ..	72
3.1.5. Mesure de la rugosité des films .....	75
3.1.5.1. Influence de la rugosité du substrat sur la rugosité du film.....	75
3.1.5.2. Influence de l'épaisseur de TiO <sub>2</sub> sur la rugosité du film .....	78
3.1.6. Énergie de surface mesurée par la technique du mouillage.....	79
3.1.6.1. Relation entre la morphologie et la mouillabilité .....	79
3.1.6.2. Influence du rayonnement lumineux sur la mouillabilité.....	80
3.1.6.3. Calcul de l'énergie de surface .....	81
3.1.7. Charge de surface .....	83
3.1.7.1. Origine du potentiel zêta .....	83
3.1.7.2. Mesure du potentiel zêta.....	84
3.1.8. Vers la réalisation de dépôts à gradient de compacité (GdC).....	86
<b>3.2. Films de TiO<sub>2</sub> obtenus par oxydation anodique .....</b>	<b>90</b>
<b>Références .....</b>	<b>91</b>

Chapitre IV – Adhérence et protection contre la corrosion .....	93
<b>4.1. L'adhérence des films .....</b>	<b>93</b>
<b>4.2. Protection contre la corrosion .....</b>	<b>98</b>
4.2.1. La corrosion biologique des biomatériaux métalliques .....	98
4.2.2. Etude de la tenue en corrosion du titane recouvert d'oxyde par MOCVD.....	100
4.2.2.1. Préparation des échantillons.....	100
4.2.2.2. Le choix de la solution .....	100
4.2.3. Suivi du potentiel en circuit ouvert (PCO) .....	100
4.2.3.1. Influence de la morphologie en section transverse.....	101
4.2.3.2. Influence de la rugosité initiale du substrat de titane .....	102
4.2.3.3. Influence de la composition allotropique .....	104
4.2.3.4. Commentaires sur les trois séries de mesures du PCO.....	104
4.2.4. Voltamétrie cyclique.....	105
4.2.4.1. Comportement du substrat nu en fonction de sa rugosité.....	106
4.2.4.2. Etude de dépôts sur des substrats de rugosités différentes .....	107
4.2.4.3. Influence de la morphologie transverse du dépôt.....	109
4.2.4.4. Discussion générale sur les résultats des tests électrochimiques .....	112
<b>Références .....</b>	<b>114</b>
Chapitre V – Evaluation de la biocompatibilité des dépôts de TiO <sub>2</sub> .....	117
<b>5.1. Généralités sur les fibroblastes et les ostéoblastes.....</b>	<b>117</b>
5.1.1. Fibroblastes.....	117
5.1.2. Ostéoblastes .....	119
5.1.3. L'adhérence des cellules sur un substrat.....	120
<b>5.2. Etude de l'interaction des fibroblastes avec les dépôts de TiO<sub>2</sub>.....</b>	<b>121</b>
5.2.1. Etude de la morphologie des fibroblastes gingivaux et du potentiel cytotoxique des dépôts de TiO <sub>2</sub> .....	122
5.2.2. Détermination de la capacité d'adhérence des fibroblastes gingivaux .....	123
5.2.2.1. Mise en évidence de la fibronectine synthétisée par les fibroblastes gingivaux .....	123
5.2.2.2. Mise en évidence des intégrines – les récepteurs qui facilitent l'adhérence des fibroblastes gingivaux à la matrice extracellulaire.....	126
5.2.3. Modifications dans l'expression des quelques protéines du cytosquelette .....	129
5.2.3.1. Evaluation de l'expression d'actine .....	130
5.2.3.2. Evaluation de l'expression de la tubuline $\alpha$ .....	132
5.2.4. Le potentiel prolifératif des fibroblastes gingivaux .....	134
5.2.4.1. Test de détection du BrdU.....	134
5.2.4.2. Test de détection du marqueur Ki67 .....	136
5.2.4.3. Test de détection du marqueur PCNA.....	137
5.2.5. Mise en évidence de l'activité des métalloprotéases de matrice (MMP) impliquées dans la dégradation des molécules de la matrice extracellulaire .....	139
<b>5.3. Etude de l'interaction des ostéoblastes avec les dépôts de TiO<sub>2</sub> .....</b>	<b>142</b>
5.3.1. Etude de la morphologie des ostéoblastes et du potentiel cytotoxique des dépôts de TiO <sub>2</sub> .....	142
5.3.2. Détermination de la capacité d'adhérence des ostéoblastes .....	144
5.3.2.1. Mise en évidence de la fibronectine synthétisée par les ostéoblastes.....	145
5.3.2.2. Mise en évidence de l'intégrine $\beta 1$ .....	148
5.3.3. Modifications dans l'expression des quelques protéines composantes du cytosquelette des ostéoblastes .....	151
5.3.3.1. Mise en évidence de l'expression d'actine .....	151

5.3.3.2. Mise en évidence de l'expression de la tubuline $\alpha$ .....	153
5.3.4. Le potentiel prolifératif des ostéoblastes .....	156
5.3.4.1. Test de détection du BrdU.....	156
5.3.4.2. Test de détection du marqueur Ki67 .....	158
5.3.4.3. Test de détection du marqueur PCNA.....	160
5.3.5. Mise en évidence de l'activité des métalloprotéases de matrice.....	161
<b>Références .....</b>	<b>165</b>
<b>Conclusions générales et perspectives .....</b>	<b>169</b>
<b>Annexe A .....</b>	<b>173</b>
<b>Annexe B .....</b>	<b>177</b>
<b>Liste des publications sur ces travaux .....</b>	<b>179</b>



## Introduction Générale

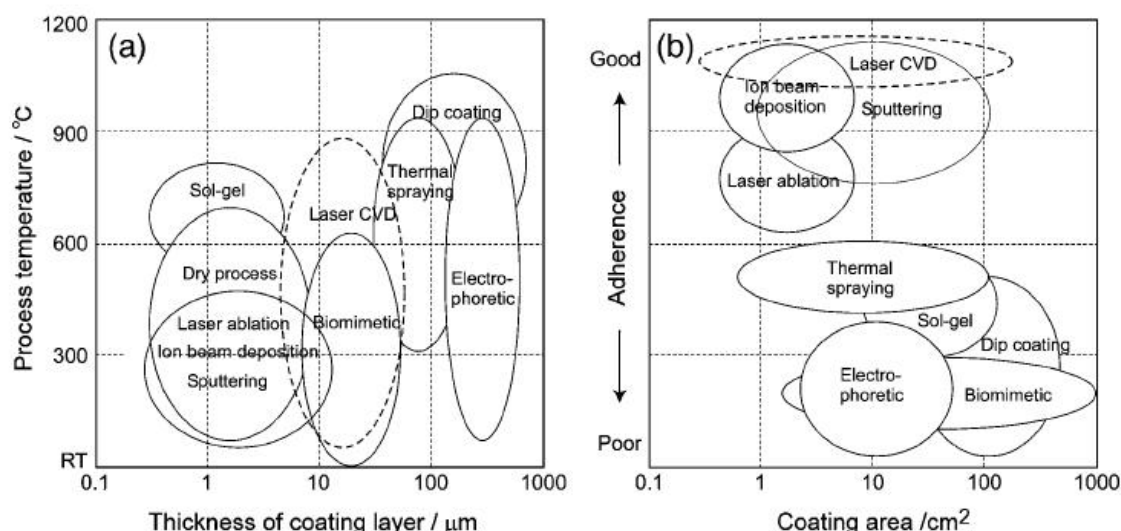
Sans doute liée à l'évolution démographique et à l'augmentation de la durée de vie, la demande en implants et prothèses est en augmentation constante. D'après une étude publiée en 2004 (Devices Marketing Report, BCC Research, Wellsley, MA, 2004), le montant des ventes des seuls implants orthopédiques dans le monde en 2003 se serait élevé à 8,7 milliards de dollars US. Avec une croissance annuelle de 12,5% on atteindrait en 2009 la somme de 17,9 milliards de dollars US. Une compétition s'est établie dans le développement de nouvelles technologies et de nouveaux dispositifs implantables de plus en plus sophistiqués. Pour aborder cette compétition dans de bonnes conditions, il est absolument nécessaire de caractériser et de bien comprendre les interactions des matériaux utilisés avec le milieu physiologique dans lequel ils sont implantés.

La science des biomatériaux est l'un des domaines les plus intéressants, voire fascinants, de la science contemporaine. De nombreuses questions sont toujours sans réponse. Nous en savons davantage aujourd'hui sur ce qu'il se passe pendant la déformation d'une pièce métallique qu'à l'interface d'un biomatériau après l'implantation. Cette difficulté vient du fait que le domaine des biomatériaux implique différentes disciplines : science des matériaux, physique, chimie, biologie et médecine, en effet, doivent communiquer et trouver un langage commun pour aborder sérieusement les problèmes des biomatériaux.

Le problème le plus souvent abordé dans l'étude des biomatériaux est celui de la réponse de l'organisme aux implants. Cette réponse n'est pas toujours favorable à cause des nombreux problèmes qui peuvent apparaître après l'implantation d'un matériau. Les métaux et les alliages métalliques implantables, recouverts de leur couche d'oxyde naturel épaisse de quelques nanomètres, sont connus pour être bio-inertes. Si l'on prend le cas du titane, il n'est pas facile de développer des liaisons chimiques avec le tissu environnant après implantation : la surface du titane manifeste peu de bioactivité *in vivo*. Pour éliminer cet inconvénient, la bio-ingénierie se propose de modifier la surface des implants, puisque c'est sur sa surface que se produisent les interactions entre un solide et son environnement et les réactions qui en résultent. Une des solutions les plus remarquables proposées pour répondre aux applications recherchées du couple revêtement - substrat est la fabrication de films minces dont les propriétés peuvent être très différentes de celles du substrat. Dans le cas de biomatériaux, cette couche mince doit à la fois résister mécaniquement, protéger le substrat contre la corrosion par les liquides physiologiques et être compatible avec les tissus biologiques, voire favoriser leur croissance suivant la fonction recherchée.

L'application d'un revêtement de nature, de composition, de microstructure, de propriétés de surface particulières sur un matériau métallique de forme et de nature diverses, a impliqué, pendant les

dernières décades, l'utilisation d'une large gamme de techniques de dépôt pour satisfaire les nombreuses particularités propres à chaque application. Ainsi, les techniques de dépôt de matériaux en couches minces, par voie chimique ou physique, sont de plus en plus développées, variées et complexes. Le choix d'une technique spécifique (Figure I.1) doit donc tenir compte de plusieurs paramètres, définis par un cahier des charges précis, pour éviter des problèmes comme les modifications de structure, de composition, de texture et même les variations dimensionnelles du substrat.



**Figure I.1.** Présentation schématique des processus de dépôt utilisés pour les biomatériaux (source : T. Goto [1])

Depuis plus de trente ans, le développement des techniques de dépôt physique (PVD) ou chimique (CVD) en phase vapeur à basse pression a conduit à leur utilisation dans un très grand nombre de domaines comme la microélectronique, la mécanique ou, dans le domaine médical, la préparation de films biocompatibles déposés sur la surface de biomatériaux.

Dans cette étude, nous avons essayé d'aborder les aspects qui concernent une possible amélioration de la biocompatibilité des matériaux métalliques implantables. Dans le contexte présenté ci-dessus, ce travail se focalise sur l'étude du procédé MOCVD pour préparer des revêtements d'oxyde de titane ( $\text{TiO}_2$ ) à partir du tétra-*iso*-propoxyde de titane (TTIP), un précurseur facilement accessible et manipulable. La technique MOCVD à basse température et à basse pression permet : (i) de respecter l'intégrité microstructurale du substrat et donc de ne pas en altérer les propriétés ; (ii) de réaliser des dépôts qui épousent parfaitement tous les contours d'une surface complexe. Les revêtements d'oxyde de titane ainsi obtenus ont la capacité d'améliorer l'intégration biologique d'un biomatériau métallique. Une telle réalisation dépend de la compréhension du mécanisme du dépôt et du contrôle des paramètres qui conduisent au dépôt envisagé.

Ce manuscrit se compose de cinq chapitres dans lesquels sont présentées successivement l'élaboration, la caractérisation et l'évaluation de biocompatibilité des films de  $\text{TiO}_2$ .

Le **premier chapitre** présente le domaine des biomatériaux et la problématique des matériaux implantés dans le corps humain : milieu corrosif, tenue mécanique, intégration dans les tissus. Nous allons montrer quelle est la place du titane et la nécessité d'améliorer sa surface. Les paramètres qui influent sur l'intégration d'un implant dans l'organisme sont décrits. Le chapitre inclut aussi les définitions du terme *biocompatibilité* et montre comment celle-ci peut être évaluée par mesure mécanique (adhérence de la couche d'oxyde), par électrochimie (résistance à la corrosion) et par culture cellulaire *in vitro* (aptitude à favoriser la croissance et la prolifération de cellules saines).

Ce chapitre présente également la démarche entreprise dans ce travail : (i) utiliser la technique du dépôt chimique en phase vapeur à partir d'un précurseur métalorganique (MOCVD) pour déposer sur du titane des films d'oxyde de titane présentant des caractéristiques physico-chimiques différentes ; préparer également des revêtements par électrochimie ; (ii) étudier la biocompatibilité des matériaux ainsi obtenus, en évaluant aussi bien la résistance à la corrosion en milieu biologique du titane ainsi revêtu que l'activité cellulaire à la surface du film d'oxyde ; (iii) voir si les différences induites dans les caractéristiques physico-chimiques des dépôts lors de leur préparation ont une influence sur la biocompatibilité.

Le **deuxième chapitre** est consacré aux principales techniques expérimentales utilisées dans ce travail. Il présente le dispositif expérimental de réalisation des films de  $\text{TiO}_2$  par MOCVD à partir du tétra-*iso*-propoxyde de titane (TTIP). La préparation de films de  $\text{TiO}_2$  par électrochimie est également présentée. Le chapitre décrit également les différentes techniques de caractérisation physico-chimique et biologique des dépôts.

Le **troisième chapitre** présente les résultats de l'analyse et de la caractérisation des dépôts obtenus par MOCVD à partir du TTIP et les dépôts anodiques. Cinétique de croissance, composition allotropique, état cristallin, morphologie, propriétés de surface sont présentés et analysés en relation avec les conditions d'élaboration. Le chapitre se termine par la caractérisation des films obtenus par électrochimie.

Le **quatrième chapitre** aborde l'adhérence des films et le comportement électrochimique, dans un milieu physiologique simulé, du titane revêtu d'oxyde de titane par MOCVD et par anodisation. Deux méthodes ont été utilisées : le suivi de l'évolution du potentiel en circuit ouvert et la polarisation cyclique.

Le **cinquième chapitre** présente l'évaluation de l'aspect strictement biologique de la biocompatibilité de films de  $\text{TiO}_2$  obtenus, au moyen de cultures de fibroblastes et d'ostéoblastes *in vitro* et de tests pour identifier les marqueurs spécifiques de la croissance et de l'adhérence des cellules sur le substrat.

Le manuscrit sera complété par une discussion générale ponctuée des conclusions visant à mieux cerner les potentialités et les perspectives du procédé MOCVD utilisant le TTIP pour l'élaboration de couches minces de  $\text{TiO}_2$  pour les biomatériaux métalliques.

## Référence

1. T. Goto, *Surface coating technology for biomaterials—morphology and nano-structure control*. International Congress Series 2005. **1284**: p. 248-256.

## Chapitre I – Etat de l’art

## Chapitre I – Etat de l’art

### 1.1. Les biomatériaux

#### 1.1.1. Qu'est-ce-qu'un biomatériau ?

Les matériaux synthétiques et naturels en contact avec les systèmes biologiques sont nommés *biomatériaux*. Des nombreuses définitions ont été développées pour le terme de *biomatériau*. Une définition qui a l'assentiment de l'ensemble des experts est la suivante : "*a biomaterial is a nonviable material used in a medical device intended to interact with biological systems*" [1]. Un peu plus tard, Williams complètera cette définition par : "*in the medical and dental area, biomaterials are used to evaluate, treat, augment or replace damaged tissues or organs*" [2].

Le facteur vraiment important qui distingue un biomatériau des autres matériaux est sa capacité de pouvoir être maintenu en contact avec des tissus du corps humain sans causer d'endommagements de quelque nature que ce soit. Les différents aspects de la coexistence entre biomatériaux et tissus biologiques constituent depuis longtemps un sujet d'intérêt pour les spécialistes en biomatériaux et pour les utilisateurs de dispositifs médicaux. Un biomatériau peut interagir avec les tissus de plusieurs manières qui peuvent aller jusqu'à compromettre la coexistence biomatériau / tissu. La compréhension des mécanismes développés dans ces interactions et l'acquisition des connaissances permettent d'améliorer la performance des dispositifs.

L'évolution des biomatériaux dans le dernier siècle fait apparaître, d'après Jandt [3] quatre générations de matériaux qui se distinguent par le degré de complexité et la capacité d'interagir avec l'environnement biologique.

*La première génération* comprend les matériaux en acier et en polyéthylène. Vers le milieu du 20<sup>ème</sup> siècle, apparaît une *deuxième génération* de biomatériaux, issus en fait du développement d'autres secteurs tels que l'aéronautique. Ces matériaux traditionnels dominent encore la plus grande partie du marché des biomatériaux. La première place revient au titane et à ses alliages. Ces matériaux sont inertes et passifs. Le corps leur est mal adapté et, dans certain cas, le biomatériau est rejeté. La méconnaissance de l'interaction biologique et médicale entre le matériau et l'organisme est responsable de cet état de fait. La majorité des progrès acquis repose sur des données empiriques.

*La troisième génération* de biomatériaux apparaît dans les années 1990. L'idée est que ce n'est pas au corps de s'adapter au matériau, mais bien au matériau d'être adapté au corps. Le terme *biomatériau actif* apparaît pour désigner des matériaux qui présentent avec les systèmes biologiques des similitudes, par exemple des similitudes de composition, au moins en surface (phosphate de calcium, hydroxyapatite, bio-glass).

Avec la *quatrième génération* de biomatériaux, on assiste à une véritable révolution. Il s'agit de matériaux qui interagissent en profondeur sur les systèmes biologiques : régulation de processus

biologiques, intégration véritable dans l'organisme, capacité de se dégrader ou de lutter contre les infections après l'implantation. Dans cette catégorie entrent aussi les biomatériaux intelligents qui adaptent leurs propriétés en fonction de stimulus extérieurs ou qui contiennent des capteurs pour surveiller les fonctions et interagir avec les systèmes biologiques. Cette génération peut utiliser les principes du *design* biologique (*biomimétisme*). Ces matériaux en sont encore au stade de la recherche et ne pénètrent que lentement sur le marché dans la mesure où les essais et leur accréditation demandent beaucoup d'argent et de temps.

Cette analyse amène Jandt à moderniser la définition de Williams pour un biomatériau et à proposer la suivante : “*a biomaterial is a man-made or a man-modified viable or non-viable material intended to interface with biological systems to evaluate, treat, augment or replace any tissu, organ or function of the body.*” Le travail présenté ici concerne des aspects de la seconde et de la troisième génération pour lesquelles des améliorations sont toujours nécessaires.

### **1.1.2. Les différentes classes de biomatériaux**

Le besoin de dispositifs nécessaires pour remplacer des parties de tissu du corps humain a conduit au développement de matériaux de plus en plus sophistiqués. Nous proposons une classification des différents biomatériaux, tenant compte de leur origine chimique. Les biomatériaux actuellement utilisés sont divisés en quatre grandes classes : métaux, polymères, céramiques et composites.

Même si les biomatériaux céramiques et polymères ont connu récemment des progrès rapides, se sont diversifiés et ont fortement pénétré le marché de biomatériaux, on ne peut pas dire que les biomatériaux métalliques vont disparaître. Les céramiques et les polymères présentent des caractéristiques intéressantes mais sont désavantagés par leurs propriétés mécaniques. On devrait donc continuer d'utiliser les biomatériaux métalliques, aux différentes faiblesses desquels il est toujours possible de remédier en modulant leurs propriétés mécano-chimiques et/ou en traitant leur surface.

#### **1.1.2.1. Les biomatériaux métalliques**

Les métaux et les alliages métalliques sont parmi les premiers biomatériaux à avoir été utilisés pour des applications biomédicales. Ils sont utilisés principalement en orthopédie (articulations, plaques, vis, clous), en stomatologie (prothèses, pièces de dentiers, pivots, plombage) et en chirurgie (instruments). La grande diversité de métaux et alliages métalliques permet la classification suivante.

**Les aciers inoxydables** - Les propriétés fortes de ces alliages sont leur dureté et leur ténacité élevée [4]. Ils sont utilisés en articulation artificielle (tige ou tête d’articulation), des plaques osseuses, barre spinale, implant dentaire, cathéter. Le plus utilisé est l’acier inoxydable 316L : Fe, C : 0,02%, Cr : 17%, Ni : 12%, Mo : 2%. En ce qui concerne les instruments chirurgicaux comme les scalpels, les ciseaux ou les aiguilles, le choix se porte sur les aciers chromés qui supportent des contraintes plus

élevées. Les recherches sont encore focalisées sur l’amélioration de la résistance à la corrosion et la prévention contre la libération d’ions  $\text{Ni}^{2+}$ , toxiques.

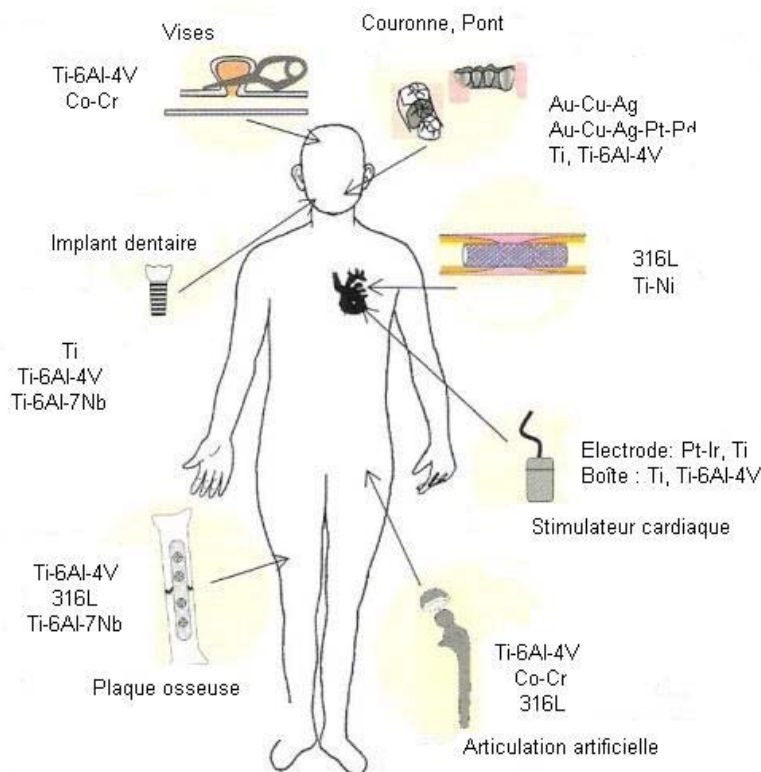
**Les alliages cobalt – chrome** - Les alliages cobalt – chrome sont principalement utilisés dans le domaine des chirurgies cardiovasculaire et orthopédique [5]. On les trouve également utilisés en implant dentaire, barre spinale et dans la reconstruction d’orbite oculaire. Les alliages les plus connus sont CoCrMoNi (Vitallium® : Co, Cr : 28%, Mo : 6%, Ni : 2%), CoCrWNi et CoCrMo. Une teneur en Cr d’environ 25-30% confère aux alliages Co-Cr une bonne résistance à la corrosion grâce à la formation spontanée d’un film d’oxyde stable  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ . Une addition de 4 à 7,5% de Mo ou Ni améliore le durcissement. On a remarqué dans les zones d’implant soumis à des frottements, la présence de particules de 0,5 à 35  $\mu\text{m}$  contenant des ions toxiques  $\text{Cr}^{6+}$  et  $\text{Co}^{2+}$ , provenant d’un relargage dans le tissu entourant la prothèse [6].

**Les alliages à base nickel** - Le nickel est un métal facile à travailler, donc les alliages à base du nickel ont servi pour la fabrication de prothèses dentaires. Comme les alliages déjà présentés, ces matériaux sont aussi susceptibles d’être fissurés par corrosion, raison pour laquelle ils sont peu employés. Un grand intérêt est manifesté pour l’alliage Ti-Ni à mémoire de forme [7, 8]. Une des applications spectaculaires est la fabrication de stents qui, injectés dans une veine sous forme compacte, se déploient au cours de la mise en équilibre thermique dans l’organisme. La résistance à la corrosion est liée à la formation d’une couche stable de  $\text{TiO}_2$ . Ces alliages sont utilisés plus particulièrement pour des implantations de courte durée ou dans le cas d’utilisation extracorporelle comme les actionneurs dynamiques programmables [9].

**Les alliages à base titane** - Le titane et les alliages de titane sont de loin les biomatériaux métalliques les plus fréquemment utilisés, grâce à leurs bonnes propriétés mécaniques. Ils représentent des matériaux de choix pour les applications biomédicales. Le titane sera plus largement discuté dans paragraphe suivant.

**Les métaux nobles** - A cette catégorie, on rattache le tantale, le palladium, le platine, l’or, l’argent, l’iridium et le niobium. Le plus connu est l’utilisation de l’or en dentisterie. Le coût élevé de ces matériaux rend leur utilisation de plus en plus rare.

La Figure 1.1 présente un récapitulatif de l’utilisation des matériaux métalliques comme dispositifs biomédicaux.



**Figure 1.1.** L'utilisation de dispositifs médicaux et les biomatériaux métalliques utilisés [10]

#### 1.1.2.2. Les biomatériaux polymères

Les polymères utilisés comme biomatériaux sont principalement des substances organiques synthétiques. Leurs propriétés macromoléculaires sont comparables à celles des composants fonctionnelles de l'environnement biologique : lipides, protéines, polysaccharides. Leurs avantages sont une mise en forme facile et une très grande diversité d'applications dans l'organisme humain, depuis la chirurgie plastique jusqu'aux artères artificielles et aux fils de suture dégradables, grâce à une gamme large de matériaux polymères disponible. Un des plus connus des biomatériaux polymères est le polyéthylène (PE) dans ses trois variantes : basse densité (LDPE), haute densité (HDPE), masse moléculaire ultra forte (UHMWPE). D'autres polymères fréquemment utilisés sont le poly(éthylène-téréphtalate) (PET), le poly(tétrafluoroéthylène) (PTFE), le poly(carbonate) (PC), le poly(méthylmétacrylate) (PMMA). Les systèmes à libération contrôlée utilisent des polylactates, polyglycolates, polyanhydrides, polyorthoesters [11]. Ont été récemment introduits le chitosane, le collagène et la fibrine, dont les molécules sont semblables ou identiques à des molécules présentes dans le corps. A cause de leur module d'Young très faible, les polymères ne sont pas très utilisés comme matériaux soumis à des charges mécaniques. Aucun polymère ne remplit parfaitement toutes les demandes cliniques.



### 1.2.2.3. Les biomatériaux céramiques

**Les céramiques bio-inertes** - Les céramiques bio-inertes, représentées par l’alumine  $\text{Al}_2\text{O}_3$  et la zircone  $\text{ZrO}_2$ , présentent des propriétés mécaniques intéressantes, principalement en compression, couplées à une inertie biologique. La plus connue, le TZP (tetragonal zirconia polycrystal –  $\text{ZrO}_2 + 3\% \text{Y}_2\text{O}_3$ ) est employée au sein de prothèses de hanche totale [12, 13]. Le point fort développé est le gradient de porosité qui permet d’adapter le module d’élasticité de l’implant à celui de l’os.

**Les céramiques bio-actives** - La caractéristique de ces céramiques est une composition chimique qui se rapproche le plus possible de celle de l’os naturel : le phosphate de calcium, les verres bioactifs à base de phosphore et de calcium [14, 15]. Dans l’élaboration de ces céramiques, la valeur de rapport Ca/P est essentiel et doit être voisin de celui de la matière osseuse (1,67). L’hydroxyapatite (HAP) et le phosphate tricalcique (TCP) sont principalement utilisés comme des revêtements qui favorisent l’incorporation des prothèses dans les tissus sans adjonction de ciment. Les verres bioactifs élaborés à partir des oxydes  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$ ,  $\text{CaO}$  et  $\text{P}_2\text{O}_5$  induisent un accrochage fort entre l’os et l’implant [16]. La tendance est de combiner les bonnes propriétés mécaniques des bio-matériaux inertes avec la propriété de rapide intégration des céramiques bio-actives. [17]

### 1.2.2.4. Les biomatériaux composites

Un biomatériau composite combine au moins deux matériaux différents, par exemple une matrice polymère et une charge en céramique [18]. Le résultat est un matériau aux propriétés supérieures à celles des composantes individuelles.

## 1.1.3. Le choix du titane



**Figure 1.2.** Le titane dans les implants médicaux : à gauche, une articulation de hanche avec tige de titane, sphère d'alumine  $\text{Al}_2\text{O}_3$  et demi-sphère en polyéthylène ; à droite, un implant dentaire dont la surface rugueuse est au contact avec l’os et la surface lisse au contact avec la gencive.

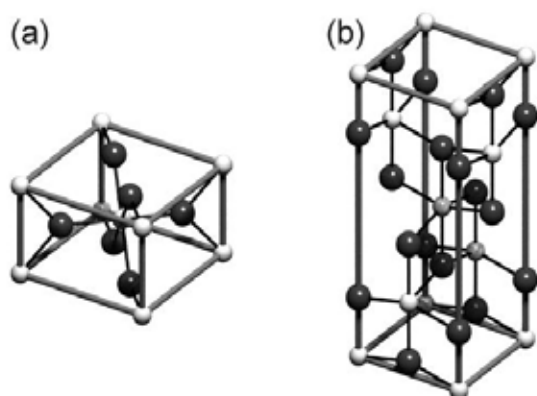
### 1.1.3.1. Les caractéristiques du titane

Parmi les biomatériaux, le titane est considéré comme ayant une biocompatibilité excellente, manifestée dans des applications diverses : dispositifs orthopédiques (articulation de hanche et de genou, plaques de fixation sur l’os, vis), implants dentaires, chirurgie maxillo-faciale (Figure 1.2).

C'est à ses propriétés mécaniques et à ses propriétés de surface que le titane doit ses bonnes performances de matériau implantable. Il possède une haute résistance mécanique et un module

d’élasticité qui le rend compatible avec les structures osseuses. La propriété de surface essentielle est la capacité du titane à former spontanément à l’air une couche stable d’oxyde de passivation, épaisse de 4 à 6 nm [19], qui le protège contre la corrosion et ralentit la libération des ions titane [20, 21]. Cette couche d’oxydation se compose d’un mélange des oxydes  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{TiO}$ ,  $\text{Ti}_2\text{O}_3$ , le plus stable étant le dioxyde  $\text{TiO}_2$ .

Le dioxyde de titane  $\text{TiO}_2$  se présente naturellement sous trois formes cristallines : brookite, anatase et rutile. Le premier est orthorhombique, les deux autres quadratiques. Les structures cristallines des deux formes allotropiques les plus fréquentes : anatase et rutile, sont présentées dans la Figure 1.3. Idéalement, ces deux structures peuvent être vues comme des empilements compacts d’anions oxyde dont les cations  $\text{Ti}^{4+}$  occupent, de façon ordonnée, un site octaédrique sur deux : empilement cubique compact pour l’anatase, hexagonal compact pour le rutile. Il y a un écart d’environ 10% entre la masse volumique de l’anatase ( $3,89 \text{ g/cm}^3$ ) et celle du rutile, plus compact ( $4,27 \text{ g/cm}^3$ ). Le rutile est la forme thermodynamiquement stable.



**Figure 1.3.** Structure cristalline : a) du rutile ; b) de l’anatase. Les atomes Ti sont les sphères blanches et les atomes O les sphères grises.

Il a été montré que le film d’oxyde qui se forme naturellement à l’air ou en solution aqueuse sur le titane métallique est amorphe dans un premier temps. Le processus de cristallisation apparaît avec l’épaississement [20]. Le Tableau 1.1 résume quelques unes des propriétés importantes de cette couche mince de passivation.

**Tableau 1.1.** Les propriétés physico-chimiques de l’oxyde de titane passif sur titane métallique

- |   |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vitesse importante de passivation et de re-passivation sur un domaine de pH très large<br/> <math>\Rightarrow</math> <b>faible vitesse de corrosion du titane sous-jacent</b></li> <li>• Faible solubilité de <math>\text{TiO}_2</math> / concentration très faible en espèces issues de la corrosion, à pH neutre :<br/> <math>\text{TiO}_2 + x \text{H}_2\text{O} \Leftrightarrow \text{TiO}_{2\text{aq}}</math> <span style="float: right;"><math>c \approx 10^{-6} \text{ M}</math></span><br/> <math>\text{TiO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} \Leftrightarrow [\text{HTiO}_3]^- + \text{H}_3\text{O}^+</math> <span style="float: right;"><math>c &lt; 10^{-10} \text{ M}</math></span><br/> <math>\text{TiO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} \Leftrightarrow [\text{Ti}(\text{OH})_3]^+ \text{OH}^-</math> <span style="float: right;"><math>c &lt; 10^{-10} \text{ M}</math></span></li> <li>• Faible (négative) charge de surface des films de <math>\text{TiO}_2</math> dans des conditions biologiques (pH = 7)</li> <li>• Constante diélectrique (<math>\epsilon</math>) proche de celle de l’eau:<br/> <math>\epsilon = 40 - 100 \Rightarrow</math> <b>interaction douce avec les protéines</b></li> </ul> |
|---|

### 1.1.3.2. Le rôle de TiO<sub>2</sub>

Puisque le titane est en contact avec le tissu, il interagit avec les fluides physiologiques à travers le film d’oxyde présent sur sa surface, responsable de la résistance à la corrosion et de la biocompatibilité. Les propriétés chimiques et structurales de cette couche jouent un rôle important dans l’absorption des protéines présentes dans des fluides biologiques, processus suivi par l’attachement des cellules sur la surface du biomatériau.

La composition chimique de l’oxyde de titane varie en fonction de l’environnement. Des expériences *in vitro* ont indiqué l’incorporation d’ions calcium et phosphate dans l’oxyde, provoquant la formation naturelle d’une couche de phosphate de calcium semblable à l’apatite. [22]. L’analyse *in vivo* d’implants de titane a montré une vitesse de libération non négligeable des ions titane [23], tandis que la croissance d’un film d’oxyde de titane, spécialement déposé, initialise l’intégration de l’implant en incorporant des ions (phosphates, calcium...) dans sa structure [24].

Le dioxyde de titane joue le rôle d’une **interface active** entre le matériau inerte (le titane) et le matériau biologique (les biomolécules, le tissu). Tout aussi important est son rôle de protection du métal contre la corrosion. L’importance des propriétés de TiO<sub>2</sub> sur la biocompatibilité sera mise en évidence dans ce qui suit, en soulignant les caractéristiques de surface qui peuvent influencer le développement du tissu autour de l’implant.

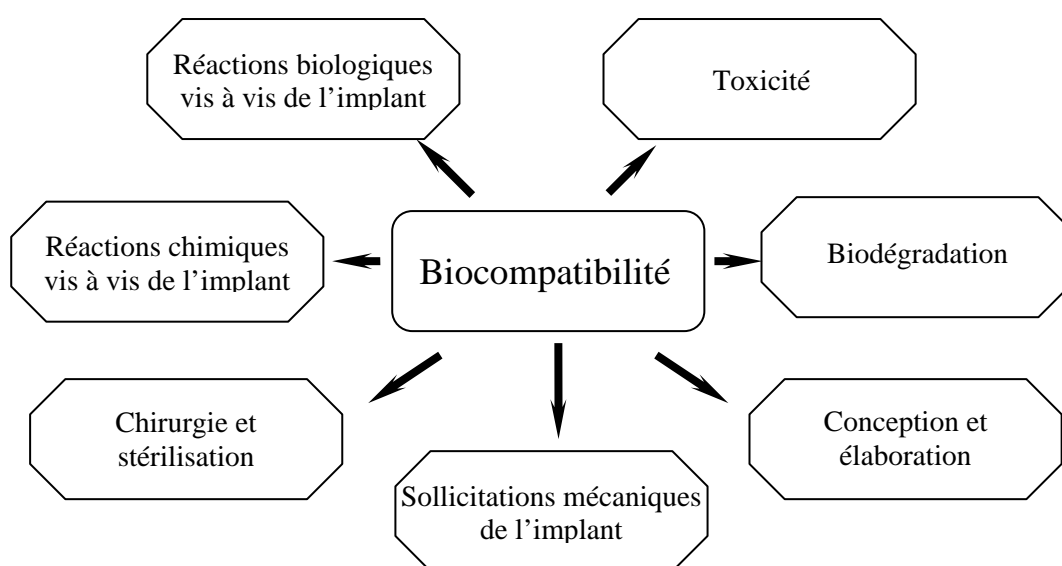
## 1.2. Biocompatibilité

### 1.2.1. Qu'est-ce que la biocompatibilité ?

Les biomatériaux ont une histoire longue de plus de mille ans. Les premiers matériaux implantés ont été l’or, l’argent et le cuivre, sans aucune notion de *biocompatibilité*, un terme apparu il y a une cinquantaine d’années. Les notions de *biomatériau* et de *biocompatibilité* ont évolué continûment en fonction des connaissances acquises et des performances des matériaux.

Initialement, la définition de la *biocompatibilité* concernait les deux premières générations de biomatériaux, les biomatériaux inertes, avant d’être adaptée aux matériaux actifs. En 1986, Williams a proposé la définition la suivante : “*biocompatibility is the ability of a material to perform with an appropriate host response in a specific application*” [1, 25]. Cette définition met en évidence les trois rôles qu’un matériau doit jouer : le matériau doit agir et pas simplement être présent dans les tissus ; la réponse doit correspondre au but recherché [26]. Considérant la diversité croissante des matériaux disponibles, des applications envisagées et des mécanismes d’interactions relevant aussi bien de la science des matériaux que de la biologie, Williams [27] propose en 2008 une définition plus complète : “*biocompatibility refers to the ability of a biomaterial to perform its desired functions with respect to a medical therapy, without eliciting any undesirable local or systemic effect in the recipient or beneficiary of that therapy, but generating the most appropriate beneficial cellular or tissue response in that specific situation, and optimizing the clinically relevant performance of that therapy.*”

L'auteur souligne que la biocompatibilité implique non seulement les réponses des deux composants du système biomatériau-tissu (réponses à considérer séparément mais qui peuvent être interdépendantes) mais également les phénomènes aux interfaces. Dans le cas d'un implant métallique, cela signifie clairement que la résistance à la corrosion du métal par les fluides biologiques est une des composantes de la biocompatibilité de l'implant, au même titre que sa réponse aux problèmes biologiques proprement dits. La Figure 1.4 présente schématiquement l'ensemble des facteurs qui jouent sur la biocompatibilité.

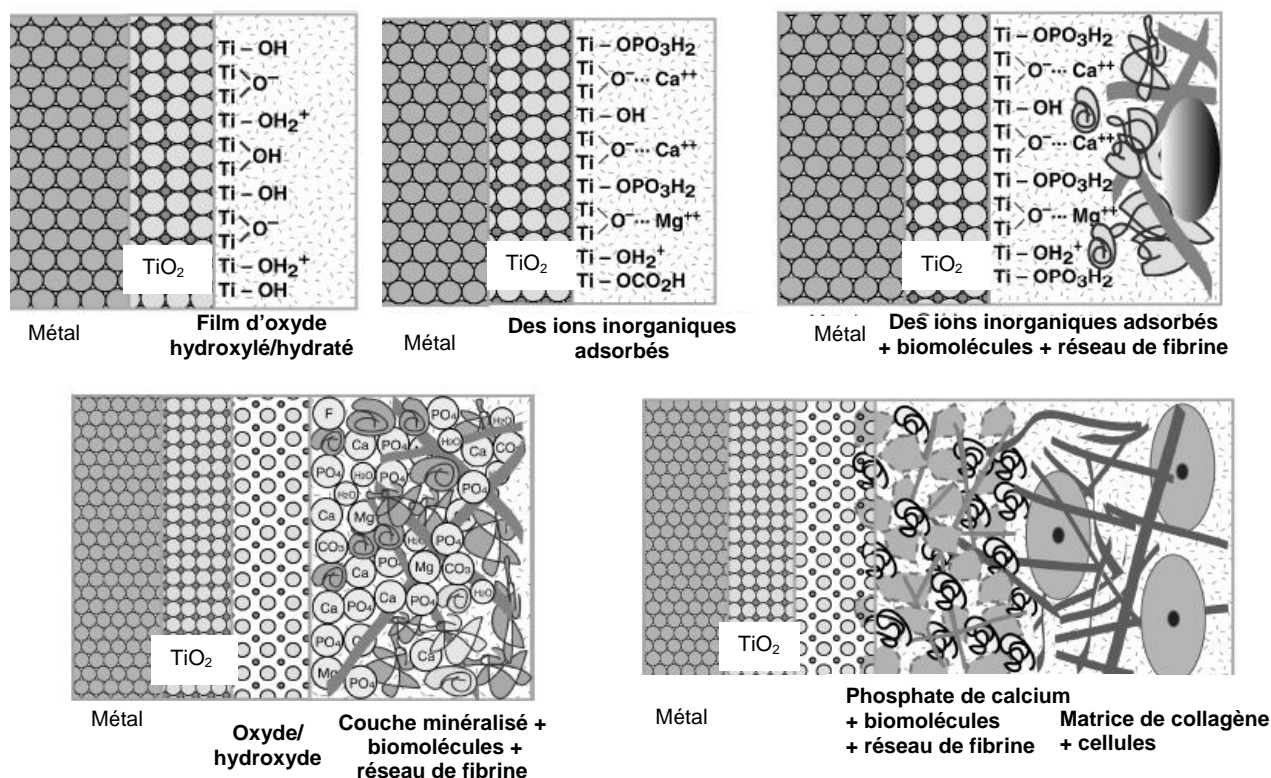


**Figure 1.4.** Présentation schématique de l'ensemble des facteurs qui jouent sur la biocompatibilité

Après avoir cerné la notion de *biocompatibilité*, avant de passer à la problématique des implants et la nécessité d'améliorer la surface, présentons une autre courte classification des biomatériaux pour mieux situer notre matériau d'intérêt entre les diverses classes de biomatériaux :

- les *matériaux bio-incompatibles* qui libèrent des ions à des concentrations toxiques, provoquant une réaction immunitaire (allergie, inflammation, nécrose, rejet) : c'est le cas des ions du vanadium ou nickel présents dans certains alliages.
- les *matériaux bio-compatibles* ou *bio-tolérés* qui, après l'implantation, sont encapsulés dans un cocon de tissu conjonctif sécrété par les cellules, qui les isole du reste de l'organisme. Si le cocon protecteur n'est pas parfaitement étanche, des échanges peuvent continuer entre le matériau et les fluides biologiques (cas des aciers inox).
- les *matériaux bio-inertes*, qui ne libèrent pas de substances toxiques. Le tissu environnant n'est pas endommagé mais le matériau ne participe pas aux processus de l'interface (cas du **titane** et de ses alliages)
- les *matériaux bio-actifs*, qui favorisent l'adhésion et la croissance cellulaire en réagissant avec leur environnement biologique ; un exemple est celui des matériaux dits *ostéoconducteurs* (HAP)

### 1.2.2. Les étapes d'intégration d'un implant



**Figure 1.5.** Les processus interfaciaux qui ont lieu à l'interface entre l'oxyde de titane et le fluide biologique en contact avec l'implant de titane. Les dimensions des espèces chimiques et biologiques ne sont pas à l'échelle.

Dans une étude publiée en 2001, Textor et al. [19] présentent les différentes étapes des interactions chimiques et biochimiques qui se produisent lors de la première phase d'exposition du TiO<sub>2</sub> à un milieu biologique (Figure 1.5). Les images sont très simplifiées et ignorent la complexité de l'interface implant/corps pour donner un résumé des réactions individuelles à l'interface, comme une cascade de processus, quelques uns étant simultanées *in vivo* et s'influençant mutuellement.

Les événements illustrés dans la Figure 1.5 comprennent :

1. hydroxylation et hydratation de TiO<sub>2</sub>, au contact avec le fluide aqueux ;
2. adsorption de cations et d'anions provenant de l'électrolyte, spécialement les ions calcium et phosphate ;
3. adsorption de biomolécules (protéines, glycoprotéines, protéoglycannes, polysaccharides) et formation d'un réseau de fibrine au contact avec le sang ;
4. poursuite de la modification de surface : croissance d'une couche oxyde/hydroxyde et précipitation du phosphate de calcium et d'autres espèces (magnésium, carbonate, fluorure) présentes dans le fluide ; réactions de réorganisation et d'échange avec le biofilm.
5. formation d'une architecture d'interface active : dépôt de matrice, formation du réseau de collagène, minéralisation.

Ces images mettent en évidence le rôle de la couche de  $\text{TiO}_2$  dans le processus de formation d'un biofilm à la surface du matériau.

### **1.2.3. La problématique des matériaux métalliques implantés dans le corps humain**

A coté de l'exigence fondamentale de biocompatibilité dans le choix d'un biomatériau métallique, une autre exigence, tout aussi importante, est la résistance à la corrosion, spécialement quand il s'agit d'un implant de longue durée. La corrosion peut en effet conduire au rejet de l'implant.

Les matériaux métalliques sont utilisés comme dispositifs biomédicaux dans différentes parties du corps humain, considéré comme un environnement physiquement et chimiquement peu hospitalier :  $37^\circ\text{C}$ , milieu salin, hautement oxygéné,  $\text{pH} \sim 7,4$ . Il est bien connu que les solutions contenant des ions chlorures agressent et corrodent les métaux. La surface des métaux exposés peut subir une dissolution électrochimique du fait du contact avec des fluides biologiques (plasma, lymphe, sang, salive). Ces fluides contiennent des ions minéraux ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}_n\text{PO}_4^{3-n}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ), et des composés organiques acides ou basiques (aminoacides, protéines, acides organiques). Le  $\text{pH}$  de ce fluide est légèrement basique, variant de 7,15 à 7,4, mais peut s'abaisser jusqu'à 5,2 pendant un processus d'inflammation [28]. La teneur en oxygène qui joue un rôle capital dans les processus de corrosion métallique dépend de la partie du corps concernée : par rapport à la composition normale de l'air, la teneur en oxygène dans le fluide intercellulaire est de 1,25 à 25% tandis que dans les artères sanguines, elle atteint 67%.

A cause de ces conditions physico-chimiques et du fait que les implants restent en contact prolongé avec le tissu, la réponse du tissu à l'implant n'est pas toujours favorable. A coté des processus inflammatoires qui peuvent toujours intervenir, un autre problème est celui des conséquences d'une éventuelle corrosion de l'implant. Comme tout solide métallique, un implant de titane peut libérer des ions métalliques nocifs dans le corps. La tenue à la corrosion est donc un aspect incontournable de la biocompatibilité d'un métal. Elle doit toujours être prise en considération dans l'évaluation du comportement d'un biomatériau, en tenant bien compte des conditions dans lesquelles il doit remplir sa fonction.

### **1.2.4. Améliorer la biocompatibilité du titane par traitement de surface**

Le contrôle des propriétés physiques, chimiques et biochimiques de la surface de l'implant est un point très important dans la conception d'un dispositif médical, puisque les premières interactions entre le matériau étranger (implant) et le milieu biologique se passent à l'interface. La stabilité d'un implant est déterminée par la manière dont il réussit à s'intégrer dans l'organisme et qui dépend, pour beaucoup, de la chimie et de la topographie de la surface.

Le titane métallique est bio-inerte. De plus la libération d'ions titane représente un danger pour l'organisme. Le film d'oxyde amorphe qui se forme spontanément à sa surface ne suffit pas à protéger l'organisme. La très faible épaisseur de ce film (quelques nanomètres) le rend

mécaniquement fragile et, même si une fois dégradé, ce film se reforme lui-même en quelques millisecondes, la dissolution d'ions métalliques dans le corps humain pendant sa régénération peut induire la libération de cytokines ostéolytiques impliquées dans le rejet de l'implant [29]. En outre, le processus de guérison à l'interface implant-tissu est lent et la fixation de l'implant de titane est faible. La modification de la surface peut changer la topographie et la chimie de surface et affecter ainsi directement les réactions biologiques. Le but de ce changement est d'améliorer l'interaction de l'implant avec l'environnement biologique et de protéger au mieux le titane contre toute attaque corrosive sur une période la plus longue possible. Le traitement va consister à recouvrir la surface d'une couche d'un matériau bioactif : les matériaux les plus utilisés sont soit organiques comme les protéines (collagène, albumine, peptides...), soit minéraux comme le phosphate de calcium de type apatitique, qui est la composante minérale principale des os, ou le dioxyde de titane.

Les paragraphes suivants présentent la grande diversité des méthodes utilisées pour améliorer le contact implant-tissu, avec des exemples tirés de la littérature, rassemblés dans le Tableau 1.3 (à la fin du Chapitre 1). La classification des méthodes utilisées pour changer les propriétés de surface peut se faire en fonction de la nature du processus ou en fonction de la modification produite. D'après Bagno et al. [30], les méthodes développées au cours des années pour modifier les propriétés de surface peuvent être divisées en traitements physiques, chimiques-électrochimiques et biochimiques.

#### 1.2.4.1. Les traitements physiques

Différents traitements de surface sont appelés *physiques* puisque ils sont utilisés pour modifier la surface par l'application d'une action externe. Ces traitements comprennent :

- **les traitements mécaniques** comme le tronçonnage, le polissage, le sablage qui peuvent changer la topographie de surface en créant une rugosité dans une gamme très large de valeurs (de 0,1 à 6  $\mu\text{m}$ ). La composition chimique de surface ne se change pas, mais ces traitements nécessitent à la fin de leur application, un bon nettoyage de surface pour éviter toute contamination de la surface par des (micro) particules provenant des disques de polissage ou des particules utilisées pour le sablage ou le lissage. Les surfaces sont sablées par projection de particules de dimensions et de nature chimique différentes : SiC,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ . La topographie finale présente des creux irréguliers dont la taille et la forme dépendent des paramètres de sablage [31]

- **les méthodes de dépôt** (physico-chimiques) qui ont comme résultat la protection ou l'activation de la surface :

- a) la technique PVD (dépôt physique en phase vapeur) ;
- b) la technique CVD (dépôt chimique en phase vapeur) ;
- c) les techniques qui utilisent un plasma : l'implantation ionique, le décapage, la pulvérisation, le sputtering ;
- d) les techniques qui utilisent un laser, en particulier pour des dépôts de phosphate de calcium : dépôt pulsé, ablation laser, laser cladding ;

- e) le traitement thermique, qui consiste en un chauffage à l’air à 400-600°C ou dans l’eau déionisée, produit une couche d’oxyde de 30 à 100 nm ou plus dans certains cas;
- f) d’autres méthodes de dépôt de couche mince : traitements thermiques, pulvérisation ionique, pulvérisation magnétron RF.

#### 1.2.4.2. Les traitements chimiques

Les modifications de surface de nature chimique incluent les processus qui apportent des modifications dans la composition chimique de la surface du matériau natif.

##### - Les traitements acides et alcalins

a) l’attaque acide consiste à plonger le matériau métallique dans des solutions aqueuses acides, non oxydantes (à l’exception du mélange HF/HNO<sub>3</sub>), à la température du laboratoire ou à plus haute température. Le titane et ses alliages manifestent une réactivité différente en fonction de la nature du mélange acide : il est possible d’induire la formation d’une couche protectrice (passivation), ou la dissolution du film céramique existant à la surface (TiO<sub>2</sub> natif), ou l’uniformisation des défauts présents à la surface, ou la formation de micropores.

b) l’attaque alcaline utilise la soude ou d’autres solutions alcalines concentrées. Dans ce cas, le pH favorise la formation et augmente donc la concentration de groupes –OH sur la surface de TiO<sub>2</sub>. Si l’attaque a lieu à plus de 100°C, la surface, après nettoyage et séchage, est très fortement hydrophile, donc bien adaptée à l’établissement de liaisons covalentes avec des molécules extérieures.

- **Les traitements électrochimiques** consistent à connecter le matériau métallique au pôle positif d’un circuit électrique. L’anode ainsi créée est immergée dans une solution électrolytique. Les méthodes les plus utilisées sont :

g) **l’électro-polissage** qui fournit une surface très lisse après dissolution très fine des défauts de surface ;

h) **l’oxydation anodique** permet une croissance de film d’oxyde de quelques nm jusqu’à quelques dizaines de µm et peut modifier aussi la composition et la topographie du film d’oxyde (depuis une surface très lisse jusqu’à une surface très poreuse), suivant la composition de l’électrolyte. Une structure poreuse est supposée incorporer facilement les ions calcium et phosphates.

- **La technique sol-gel** est une méthode très utilisée pour la synthèse de films céramiques (< 10 µm d’épaisseur) sur la surface de biomatériaux. Ces types de films sont très facilement préparés sur la surface du titane ou sur la surface du titane modifié. Il est également facile de contrôler leur composition, leur structure et leur homogénéité en jouant sur le choix des précurseurs et de la technique de formation du gel. Il est possible d’obtenir trois types de films céramiques d’intérêt biologique : l’oxyde de titane, des verres type *bioglass* et du phosphate de calcium. L’amélioration de l’adhésion entre ces couches et le titane fait encore l’objet de recherches.



### 1.2.4.3. Les traitements biologiques

La surface du biomatériau est fonctionnalisée par greffage de molécules bio actives. L’immobilisation de biomolécules sur la surface du titane est utilisée pour contrôler l’adhésion de cellules. Le choix des molécules est guidé par ce que l’on sait des fonctions spécifiques des cellules concernées. Le but de cette modification de la surface est d’induire une réponse cellulaire par l’immobilisation des peptides, protéines ou des facteurs de croissance sur la surface. La procédure offre l’avantage d’améliorer la biocompatibilité sans affecter les propriétés de matériau massif et de présenter un nouveau concept de *surface biomimétique*. Le greffage peut se faire par simple adsorption physique ou par l’établissement de liaisons chimiques fortes.

- **L’adsorption physique** est simple et réversible. L’adsorption physique s’effectue très rapidement, par contact d’une solution des biomolécules (aminoacides, peptides, protéines, composants du sang) avec la surface du biomatériau.

- **La liaison chimique** implique l’attachement covalent d’une biomolécule sur une surface solide à l’aide d’un agent de couplage ou d’une couche d’accrochage. On distingue quatre modes de fonctionnalisation : silanisation, photochimie, électrochimie et auto assemblage d’une mono couche. Un article intéressant sur les modifications biochimiques de la surface de titane a été écrit par Xiao et co. [32]

Il est possible de prévoir que deux directions de recherche vont particulièrement se développer : la compréhension des mécanismes qui gouvernent les réponses de l’organisme à un implant ; et, comme conséquence, l’identification de nouvelles molécules utilisées comme signal biochimique pour déclencher l’adhésion et la croissance cellulaire.

### 1.2.5. Les paramètres de surface qui influencent l’intégration d’un implant

Le Tableau 1.2 présente, d’après Williams [27], les principales caractéristiques d’un matériau qui peuvent avoir une influence sur sa réponse de structure hôte dans un milieu biologique. Ces facteurs se rapportent les uns au matériau massif, les autres à sa surface.

De toutes ces caractéristiques, la topographie et les propriétés physico-chimiques de la surface sont les plus importantes. La relation entre ces caractéristiques et la réponse biologique du matériau, leur effet sur l’absorption des protéines et sur l’activité cellulaire sont très complexes et pas encore bien élucidés.

**Tableau 1.2.** Les principales caractéristiques qui peuvent influencer la réponse de structure hôte d'un matériau [27].

Composition du matériau massif, micro-(ou nano)-structure, morphologie
Cristallinité et cristallographie
Constantes élastiques
Teneur en eau, balance hydrophilicité/ hydrophobicité
Macro-, micro-, nano-porosité
Composition chimique de la surface, gradients de composition chimique, mobilité moléculaire de surface
Topographie de la surface
Energie de surface
Propriétés électriques et électroniques de la surface
Paramètres de corrosion, tendance à libérer des ions, toxicité des ions métalliques (pour les matériaux métalliques)
Profil de dégradation, produits de dégradation et leur toxicité (pour les matériaux polymères)
Produits du lessivage, additifs, catalyseurs, contaminants et leur toxicité (pour les matériaux polymères)
Profil de dissolution/dégradation, toxicité des produits de dégradation (pour les matériaux céramiques)
Profil de libération de débris d'usure

#### 1.2.5.1. La topographie de surface

Le comportement des cellules et des tissus à l’interface d’un implant peut être influencé par la topographie, aussi bien macroscopique que microscopique, de la surface. La topographie de surface joue un rôle fondamental dans la régulation du comportement des cellules (morphologie, orientation et adhésion, prolifération et différenciation). Des toutes les caractéristiques d'un matériau, il semble que la topographie de surface soit la plus étudiée. La réaction des cellules à la topographie de la surface sur laquelle elles adhèrent est un des premiers phénomènes observés dans la culture du tissu et joue un rôle majeur sur l’évolution et les propriétés de l’interface implant-tissu (par exemple, l'ostéointégration). La topographie d'une surface a deux composantes : sa rugosité et sa morphologie.

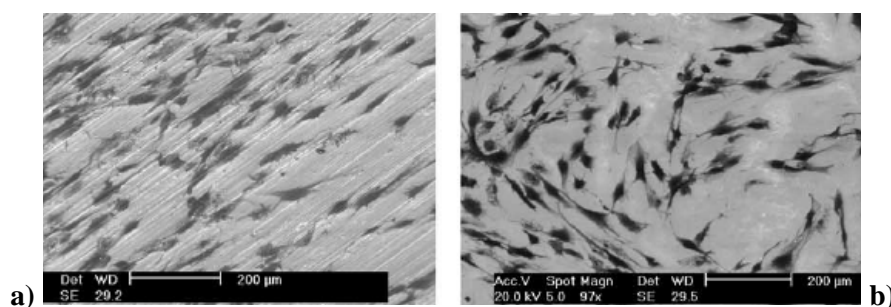
##### *Rugosité de la surface*

La surface d’un implant de titane peut être considérée lisse, si la rugosité moyenne  $R_a$  est inférieure à  $1\mu\text{m}$ , et rugueuse dans le cas contraire. Wennerberg et al. [33] ont suggéré que la surface est lisse si la rugosité est comprise entre  $0,5$  et  $1\mu\text{m}$ , moyennement rugueuse si elle est comprise entre  $1$  et  $2\mu\text{m}$ , et rugueuse si elle supérieure à  $2\mu\text{m}$ . Les expériences réalisées au cours des années, ont montré que la réponse des cellules à la surface du titane varie selon le type et l’état de maturation des cellules. Des tests *in vitro* et *in vivo* ont amené plusieurs auteurs à conclure que l’attachement des ostéoblastes est renforcé par le caractère rugueux de la surface [34-37]. Au contraire, des cellules épithéliales et des fibroblastes adhèrent mieux et prolifèrent davantage sur des surfaces lisses que sur des surfaces rugueuses [38, 39]. Les macrophages sont les premières cellules qui viennent à l'interface tissu/implant et les expériences ont montré qu’ils préfèrent les surfaces rugueuses aux surfaces lisses

[40]. D'autres études ont essayé d'analyser le comportement de cellules fibroblastes et de cellules ostéoblastes sur des surfaces identiques [41, 42]. Les deux types cellulaires prolifèrent de manière semblable lorsque la rugosité est comprise entre 0,4 et 1,15  $\mu\text{m}$ .

Des examens approfondis d'expériences de culture cellulaire sur des surfaces de rugosités variées ont débouché sur des conclusions non concordantes. Les différences dans les observations viennent probablement de la diversité de lignée cellulaire et du choix qui a été fait. Par exemple, dans le cas d'ostéoblastes, des auteurs ont utilisé une culture de cellules primaires [43], tandis que d'autres utilisent la lignée d'ostéosarcomes MG63 [44, 45].

L'effet de la rugosité sur l'adhésion cellulaire résulte probablement du fait que les surfaces rugueuses sont capables d'absorber plus de fibronectine (une protéine présente dans le sérum) que les surfaces lisses [46]. Cette protéine est impliquée dans l'attachement et l'étalement des cellules sur le substrat, par interaction avec les glycosaminoglycanes et le cytosquelette [47], en préservant la synthèse des protéines extracellulaires [48]. Sur les surface lisses, les cellules présentent une morphologie bien étalée et un réseau de collagène bien développé, tandis que sur des surfaces rugueuses elles adoptent une forme sphérique (ronde) ou une forme cuboïde avec des extensions cytoplasmiques pour l'ancrage sur les reliefs de la surface et la communication inter cellulaire. Donc, la forme adoptée par une cellule dépend en partie du relief de la surface. Les cellules adhèrent sur un substrat (non-vivant) à l'aide des contacts focaux (ou adhérences focales), distribués sur la surface de la membrane cellulaire qui au contact du substrat. Ils ne sont visibles qu'aux extrémités des extensions cellulaires [49]. Dans le cas des chondrocytes, sur une surface de titane, l'effet de la rugosité sur leur prolifération dépend de l'état de maturation des cellules [50].



**Figure 1.6.** Exemples de cellules attachées sur des surfaces de rugosités différentes : a) des fibroblastes après 4 jours de culture sur une surface de NiTi poli 400 ; l'orientation des cellules est imposée par les rayures de polissage ; b) des fibroblastes après 4 jours de culture sur une surface de TiNi poli 2400 [51]; les cellules ne montrent pas d'orientation préférentielle.

La grande majorité des études sur l'influence de la rugosité sur les cultures cellulaires ont été réalisées sur des surfaces micro structurées. Dans le cas d'une surface qui présente une morphologie bien définie (par exemple des rayures de polissage), on a constaté une relation entre la micro morphologie spécialement créée et l'orientation des cellules [51], un processus nommé *guidage de contact* (Figure 1.6). En général, sur des surfaces rayées, les cellules s'alignent le long de l'axe des rayures [52]. Ce processus est souvent accompagné par l'organisation des éléments constitutifs du

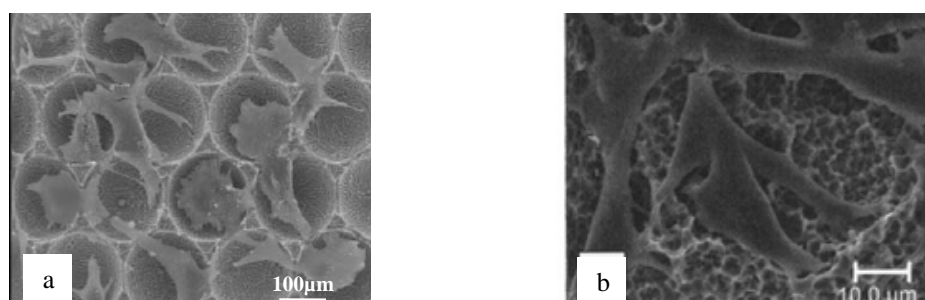
cytosquelette (actine, microtubules), suivant une orientation parallèle aux traces présentes sur la surface de matériau.

Plus récemment, ces études se sont focalisées aussi sur la nano topographie de surface qui est supposée avoir un rôle important dans l'orientation et la migration des cellules [53, 54]. Ces études contribuent à la compréhension du comportement des cellules puisque l'adhérence des structures sur un substrat *in vivo* dépend de quelques caractéristiques à l'échelle nanométrique [55].

### b) Morphologie de surface

Toutes les cellules adhérentes, soit *in vitro* ou *in vivo*, doivent s'adapter à la morphologie de la surface. Les cellules peuvent discriminer non seulement entre des surfaces de rugosités différentes, mais aussi entre des surfaces de morphologies différentes, même si elles ont des rugosités comparables.

Un des premiers aspects liés à la morphologie de la surface est la porosité : en effet la réponse des cellules montre qu'elles sont sensibles à de petites différences de taille des pores. Stangl et al. [56] ont étudié l'adhésion des ostéoblastes sur un implant de titane de géométrie poreuse et ont conclu que le facteur important n'est pas tant la surface spécifique mais la microstructure de l'implant. Pour le développement des tissus osseux, la taille de pore favorable est de 10 à 500  $\mu\text{m}$ , quoiqu'une limite de 75  $\mu\text{m}$  ait été trouvée dans une étude moins récente [57]. Li et al. [58] avancent qu'une surface présentant des pores de 140  $\mu\text{m}$  permet une croissance maximale des cellules osseuses. Pour Homsy [59] des pores de 300  $\mu\text{m}$  sont les plus favorables et Pilliar [31] a proposé une dimension minimale de 50  $\mu\text{m}$ . Une dimension de 100  $\mu\text{m}$  est fréquemment citée comme la limite pour la dimension des pores quand il s'agit de la croissance d'ostéoblastes. La seule augmentation de la surface des pores ne suffit pas pour améliorer la prolifération cellulaire, la vitalité des cellules ou leur capacité de synthèse. Il est intéressant de noter que la profondeur d'une cavité a plus d'influence que sa largeur sur l'orientation des cellules. Si les détails de la morphologie de surface ont des dimensions nettement plus grandes que les cellules, il n'y a pas d'effet d'orientation. Dans le cas contraire, l'effet sur l'orientation est plus manifeste. Pourtant, dans la phase initiale de prolifération, les cellules prolifèrent mieux sur une surface lisse que sur une surface rugueuse, grâce à une croissance rapide. Mais une fois la prolifération bien établie, c'est sur une surface poreuse qu'elle se poursuit le mieux. La Figure 1.7 montre un exemple de deux morphologies de surface différentes sur lesquelles ont été cultivées des ostéoblastes.



**Figure 1.7.** Exemples des cellules attachées sur différentes topographies de surface : a) des ostéoblastes étalées sur une surface faite de cavités [60] b) des ostéoblastes sur une surface de titane sablée ; les cellules sont accrochées dans des microcavités [45]

Un autre aspect de la topographie d’un biomatériau est sa morphologie en section transversale. Un matériau peut présenter des pores à sa surface ou sur toute sa section transversale. Dans le cas où la partie active du matériau est un film déposé à sa surface, la structure de la section transverse du dépôt est également une caractéristique importante.

Une structure poreuse peut faciliter l’incorporation d’ions minéraux, très importants dans l’interaction entre l’implant et le milieu biologique [61]. Un film compact peut être une barrière chimique efficace contre la libération d’ions métalliques, éventuellement toxiques, provenant de l’implant [62]. De ces faits, est née récemment l’idée de déposer sur la surface du biomatériau un film à gradient de compacité, comme l’ont réalisé Zhu et al [63].

Bien que de nombreuses études existent sur la réponse biologique aux caractéristiques de surfaces micro- et nano-structurées, la recherche progresse encore car la topographie n’est qu’un des nombreux paramètres qui affectent l’intégration d’un implant.

#### **1.2.5.2. La chimie de surface**

La sensibilité des cellules aux propriétés physico-chimiques des biomatériaux est bien connue. Particulièrement importantes sont l’énergie de surface et la charge de surface du matériau.

##### **a) L’énergie de surface**

L’énergie de surface joue un rôle dans la maturation et la différenciation des cellules osseuses. L’interaction entre la surface d’un biomatériau et son environnement est un processus dynamique dans lequel l’absorption de protéines est un facteur clé. L’énergie de surface, dans le moment initial, joue un rôle majeur dans la sélection des protéines qui seront absorbées sur la surface et sur l’adhérence des cellules sur la surface. En général, la force de l’adhérence cellulaire est proportionnelle à l’énergie de surface : ainsi, sur les métaux ayant une énergie de surface élevée l’adhérence cellulaire est-elle plus forte que sur les polymères d’énergie de surface faible [64].

La plupart des études relient l’énergie de surface à la rugosité ou à la texture [45, 65-68], à cause du rôle joué par ces deux paramètres sur la mouillabilité de la surface. La mouillabilité d’une surface est un bon indice pour évaluer son énergie, mais son influence sur la forme et sur l’orientation de cellules cultivées sur des surfaces micro-texturées reste difficile à quantifier [66].

Dans la littérature, le concept d’énergie de surface est abordé sous deux aspects, en évaluant l’absorption des protéines et l’adhérence des cellules. Les cellules adhèrent facilement sur les surfaces hydrophiles, mais moins facilement sur les surfaces hydrophobes [35, 45]. Les protéines, quant à elles, sont absorbées en plus grande quantité sur les surfaces hydrophobes que sur les surfaces hydrophiles [69-71]. Les opinions ne sont pas toujours convergentes. Les protéines impliquées dans le processus d’adhérence sont nombreuses, les facteurs intervenant sont d’origines diverses, ce sujet est donc toujours une source de recherches.

L’énergie de surface du titane, dépend aussi de la composition chimique de la surface. Normalement, la surface du titane propre doit être hydrophile grâce à la forte polarité des liaisons Ti-O

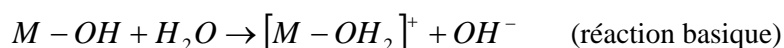
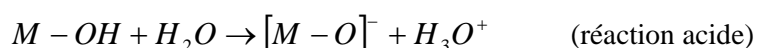
dans l’oxyde de titane formé spontanément à l’air. Cet oxyde natif a une énergie de surface appréciable. Il peut lier des groupes OH et des molécules d’eau. Les surfaces à énergie de surface élevée absorbent aussi des hydrocarbures contaminants présents dans l’atmosphère. La composition chimique de la surface est altérée avec, pour résultat, une diminution du caractère hydrophile. L’énergie de surface peut également être modifiée par les procédures de nettoyage et traitement de surface. On connaît aussi l’effet du rayonnement UV qui augmente considérablement l’énergie de surface du dioxyde de titane. Enfin, il est important de mentionner qu’une amélioration de l’énergie de surface n’assure pas toujours le succès d’un implant [72].

### b) Charge de surface

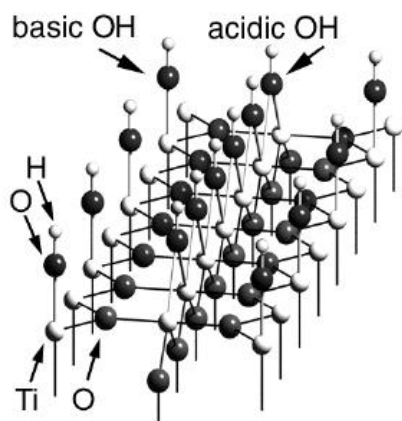
Deux exemples illustrent l’influence que peut avoir la charge de surface d’un matériau sur son aptitude à servir d’implant. En opérant sur des échantillons métalliques possédant des densités de charge de surface  $Q_e$  différentes (acier inox 316L, HS25, Ti6Al4V, Ta), Hallab et al. ont montré que la force d’adhérence de cellules fibroblaste dépend de  $Q_e$  [64]. Cai et al. ont fonctionnalisé la surface de films minces de titane en y accrochant des groupements  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ,  $-\text{NH}_2$ , ou  $-\text{COOH}$ . Ils ont mis en évidence des différences de comportement de ces différentes surfaces vis-à-vis de l’absorption des protéines (moins le potentiel zêta est élevé moins les protéines sont adsorbées) et, par voie de conséquence, de la prolifération *in vitro* de cellules ostéoblastes [73].

La charge de surface d’un matériau est considérée comme l’un des principaux facteurs physiques impliqués dans l’évolution biologique des tissus autour d’un implant. Elle dépend de la composition chimique de la surface du matériau, de la composition du fluide avec lequel le matériau est en contact, ainsi que du pH de ce fluide [74].

Textor et al. [19] ont résumé les mécanismes qui déterminent la charge de surface d’un matériau métallique  $M$  multivalent, comme l’est le titane, lors de son immersion dans un électrolyte aqueux. Avant l’immersion, la surface est couverte d’une légère couche d’oxyde à laquelle sont généralement accrochés des molécules d’eau et des ions hydroxydes  $\text{OH}^-$ , du fait de la présence de vapeur d’eau dans l’atmosphère. Lors de l’immersion, l’hydratation du film d’oxyde augmente la concentration en ions  $\text{OH}^-$ . Les ions  $\text{OH}^-$  attachés aux cations  $M$  ont des propriétés acido-basique qui dépendent du cation et de la manière dont se forment les liaisons  $M\text{-OH}$ . Les hydroxydes et les complexes hydroxo formés avec les cations multivalents sont en général amphotères [75]. Les deux équations suivantes rendent compte, de manière simplifiée, de cette possibilité de posséder à la fois un caractère acide et un caractère basique :



La première réaction conduit à la formation d’une charge négative sur la surface, et la deuxième à celle d’une charge positive.



**Figure 1.8.** Schéma d'une surface de titane oxydé en contact avec de l'eau. Ce schéma montre l'arrangement des atomes Ti et O sur la surface (110) du rutile, avec des ions OH soit basiques (liaisons Ti-OH terminales) soit acides (liaisons Ti-O(H)-Ti en pont) [19]

Il est généralement admis qu'une surface d'oxyde de titane présente deux types de groupements hydroxyde, l'un plutôt acide, l'autre plutôt basique. Ils diffèrent par leur mode de liaison aux cations  $Ti^{+}$  : l'hydroxyde basique est lié à un seul cation (liaison terminale), tandis que l'hydroxyde acide est lié à deux cations de Ti (liaison en pont, conduisant à une augmentation de la polarisation et à un transfert électronique de l'atome d'oxygène au cation de titane) [76]. Un schéma de la structure de surface de  $TiO_2$  avec les deux types d'hydroxydes est montrée sur la Figure 1.8.

Une surface d'oxyde du titane au contact avec de l'eau est très hydroxylée. Des mesures du point iso-électrique (PIE) conduisent à lui attribuer une légère charge négative au voisinage du pH physiologique, à cause de la déprotonation d'une partie des groupes  $-OH$  acides. On pense que l'excellente biocompatibilité de l'oxyde de titane est en partie dû au caractère commun des ions hydroxydes et au fait que la surface est faiblement chargée, ce qui évite ainsi aux protéines une forte interaction et dénaturation.

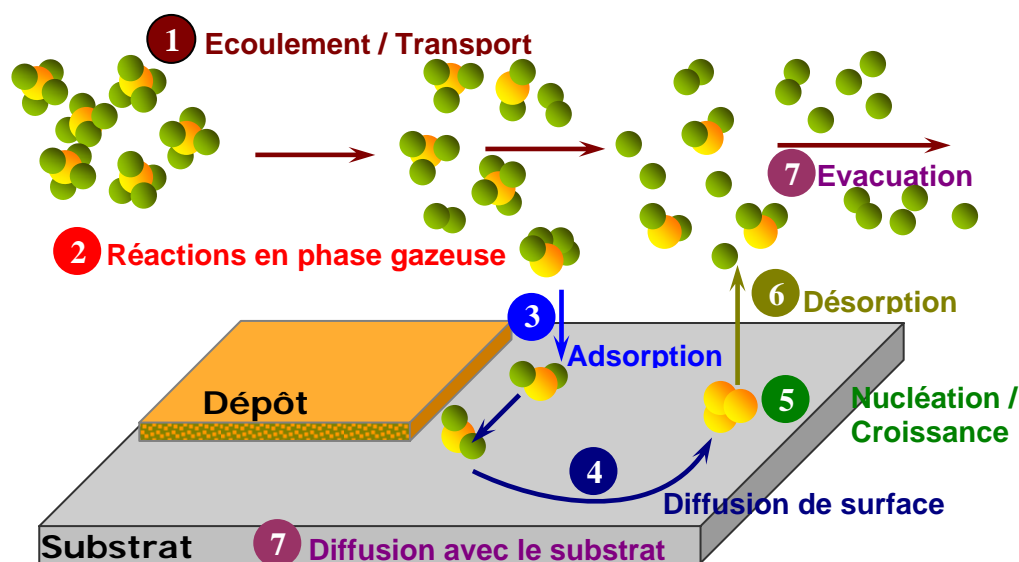
La charge de surface change en présence d'ions dans le liquide en contact avec la surface. Par exemple, dans les fluides corporels simulés contenant des ions calcium, la charge de surface à l'interface oxyde / électrolyte évolue rapidement du fait de l'adsorption d'ions  $Ca^{2+}$  induisant une élévation du PIE. De plus, une double couche électrique se forme, dont la composition dépend du PIE de la surface de l'oxyde et des ions présents dans la solution et de leur concentration.

### 1.3. La technique MO-CVD pour fabriquer un biomatériau $TiO_2/Ti$

#### 1.3.1. Généralités sur les procédés CVD et MO-CVD

La technique CVD (*Chemical Vapour Deposition*) est une technique de plus en plus utilisée pour l'élaboration des couches minces. Le procédé consiste à faire réagir des réactifs gazeux (les *précurseurs*) transportés en phase vapeur sur ou au voisinage d'un *substrat* activée énergétiquement. Ce type de déposition fournit des matériaux solides, sous forme d'une couche mince, dont la (nano) structure peut être contrôlée de manière reproductible. Les autres produits de réaction doivent être gazeux afin d'être facilement éliminés du réacteur. La réaction nécessite un apport d'énergie pour

activer la réaction chimique. Cet apport d’énergie influence l’adhérence du dépôt. En *CVD thermique*, l’énergie est produite par activation thermique, en chauffant le substrat. Le précurseur est transporté jusqu’au substrat sous forme de vapeur, généralement par un gaz inerte dit *gaz vecteur*. La technique permet d’obtenir de films minces de métaux et composés métalliques et de céramiques oxydes et non oxydes sur des substrats variés. Lorsque le précurseur est un complexe métal-organique, on parle de MO-CVD.



**Figure 1.9.** Illustration des diverses étapes du procédé CVD

Une opération de dépôt chimique en phase vapeur (CVD) activée thermiquement comporte schématiquement sept étapes, décrites sur la Figure 1.9 :

1. transfert de matière dans la phase gazeuse, de l'entrée du réacteur jusqu'à la surface du dépôt ; apport par convection (forcée, naturelle) des espèces gazeuses jusqu'au voisinage du substrat ;
2. réactions en phase gazeuse pendant le transfert ;
3. adsorption (dissociative ou non) du gaz précurseur sur la surface du solide ;
4. diffusion des molécules adsorbées en surface jusqu'aux sites de croissance ;
5. réactions chimiques éventuelles en surface : incorporation des atomes du dépôt (nucléation - croissance)
6. désorption des produits de réaction ;
7. transfert de matière des produits de réaction depuis la zone de dépôt jusqu'à la sortie du réacteur ; diffusion éventuelle d'atomes du dépôt vers le substrat (et vice versa).

Les avantages de la technique CVD sont les suivants :

- production de films uniformes, bien adhérents, à une vitesse de dépôt assez élevée (quelques nm à une dizaine de mm par heure), avec une bonne reproductibilité ;
- conformité du dépôt à la forme de la surface du substrat quelle que soit sa complexité ;
- capacité de contrôler et de faire varier la structure cristalline, la morphologie de surface et l'orientation du matériau déposé en jouant sur les paramètres du procédé ;



- vitesse de dépôt ajustable;
- l'emploi de précurseurs métal-organiques (MO-CVD) permet d'opérer à une température de dépôt relative basse, donc de traiter des substrats thermiquement fragiles ;
- prix raisonnable pour la technique CVD conventionnelle.

### 1.3.2. Pourquoi utiliser la technique MOCVD pour déposer du TiO<sub>2</sub> sur du titane ?

Grâce à leurs propriétés attractives (réfractivité élevée, constante électrique élevée, propriétés de semi-conducteur, activité photocatalytique, biocompatibilité), les couches minces de TiO<sub>2</sub> ont représenté toujours un intérêt dans la recherche. La fabrication de ces films a conduit au développement d’une série de techniques de plus en plus sophistiquées et contrôlables.

La nécessité d’améliorer les propriétés de surface, la résistance à la corrosion et le développement adéquat du tissu cellulaire, conduit à rechercher une méthode qui permette d'obtenir des films d’oxyde de titane présentant une large gamme de morphologies et de propriétés de surface. Il est également très important que cette méthode permette de contrôler les paramètres de surface de façon reproductible. La technique MOCVD répond à ces exigences. Elle permet de produire des films de pureté, de composition, d'épaisseur, de microstructure et de morphologie superficielle variées, contrôlables et reproductibles.

Si la préparation de couches minces de TiO<sub>2</sub> par la technique MOCVD a été largement utilisée depuis de nombreuses années pour des applications diverses, son utilisation en vue d'applications cliniques est très récente. Le premier travail publié semble être celui de Caselatto et al., en 2001 [77]. Après avoir préparé des dépôts par MOCVD, les auteurs les ont analysés après les avoir immergés dans un milieu contenant des cellules ostéoblastes. Leurs analyses ont prouvé que des cellules s'étaient bien attachées aux dépôts. En 2003, Giavaresi et al. ont publié deux études plus détaillées sur la biocompatibilité *in vitro* [78] et *in vivo* [79] de films de TiO<sub>2</sub> obtenus par MOCVD. Les résultats indiquent une bonne biocompatibilité en termes de cytotoxicité, d'adhérence et de prolifération.

### 1.3.3. L'objectif de ce travail

Le point de départ de ce travail est le constat du peu de travaux accomplis jusqu'à présent et du manque d'études approfondies sur la biocompatibilité, au sens large de ce terme, des films de dioxyde de titane préparés par MOCVD. Notre projet consiste donc à préparer par MOCVD des échantillons de couches minces de TiO<sub>2</sub> présentant une large diversité de propriétés structurales (rugosité, morphologie, texture, épaisseur) et physico-chimiques (composition allotropique, charge et énergie de surface) en jouant sur les paramètres du procédé. Des dépôts d'oxyde seront également préparés par anodisation du titane afin de pouvoir établir des comparaisons entre les deux familles de dépôts. Une fois les propriétés bien caractérisées (diffraction des rayons X, microscopie électronique à balayage, mesure de la rugosité, évaluation de l'adhérence...), l'étude portera sur les deux aspects de la

biocompatibilité des dépôts : d'une part leur adhérence et leur capacité à protéger le titane contre la corrosion par un fluide biologique, d'autre part leur aptitude à héberger des cellules fibroblastes et des cellules ostéoblastes et à favoriser leur développement *in vitro*. Une tentative de mise en relation des comportements observés avec les caractéristiques des dépôts terminera ce travail.



**Tableau 1.3.** Divers traitements de modification de la surface du titane.

Modification de surface	Composition de surface	Topographie	Référence
<b><u>A.- Traitements physiques</u></b> <b>Traitements mécaniques</b> 1. polissage 2. sablage <b>Dépôts physico-chimiques</b> 1. PVD 2. CVD 3. Traitement laser : <i>dépôt par laser pulsé</i> <i>ablation laser</i> <i>laser cladding</i> 4. Traitement avec du plasma : <i>implantation ionique</i> <i>plasma discharge</i> <i>plasma cleaning</i> <i>plasma sputtering</i> <i>plasma spraying</i> 5. Autres méthodes Oxydation micro-arc (MAO)	Surface de Ti Surface de Ti  Couche de TiO <sub>2</sub> (rutile) Couche de TiO <sub>2</sub> (anatase)  Couche de phosphate de calcium Couche de phosphate de calcium Couche de phosphate de calcium  TiO <sub>2</sub> (rutile) Couche de collagène TiO <sub>2</sub> avec contaminants inorganiques Couche mince de phosphate de calcium Couche de phosphate de calcium  TiO <sub>2</sub> (mélange anatase - rutile)	Rayures de polissage, Ra = 0,24 - 1,9 µm Gradient de rugosité, Ra = 0,04 - 3 µm  Pas de topographie spécifique Nanostructuré, Ra : 0,54 µm  Micro et macroparticules sphériques Petits grains  Couche dense, nanostructurée, grains ~ 50nm Surfaces hydrophiles et hydrophobes  Surface très lisse Surface poreuse  Couches poreuses, Ra : (0,5 – 3 µm)	[37, 80, 81] [82, 83]}  [84] [78, 79]  [85, 86] [87] [88]  [89] [90, 91] [92] [86] [93]  [94, 95]
<b><u>B.- Traitements chimiques</u></b> attaque acide traitement alcaline oxydation anodique traitement hydrothermal électropolissage dépôt sol-gel	Surface de Ti Surface de Ti, titanate de Na TiO <sub>2</sub> (avec des ions de P,Ca, S implantés) Hydroxyapatite Surface de Ti TiO <sub>2</sub> (rutile)	Structure ordonnée à plusieurs niveaux Surface poreuse (Φ pores = 0,3 µm) Ra = 0,65 Surface poreuse Surface poreuse, Ra = 0,6 µm Cavités (10, 30 ou 100 µm) Aucune topographie particulière	[39, 40, 96, 97] [98] [63, 99, 100] [97, 101] [60, 102, 103] [100, 104]
<b><u>C.- Dépôts biomimétiques</u></b> 1. liaison covalente 2. adsorption physique	Ti avec recouvert avec des peptides Phosphate octocalcique, Hydroxyapatite	Sans influence sur la topographie Ra = 2,5 µm, des cristaux plats	[105] [15, 84]

## Références

1. D.F. Williams, *Proc. of a Consensus Conf. of the Eur. Soc. for Biomater.* . Elsevier, New York, March 3-5, 1986. 4.
2. D.F. Williams, J. Black, P. J. Doherty, *Biomater.-Tissue Interfaces*. Advances in Biomaterials. Vol. 10. 1992, Amsterdam: Elsevier.
3. K.D. Jandt, *Evolutions, Revolutions and Trends in Biomaterials Science – A Perspective*. Advanced Engineering Materials, 2007. 9(12).
4. H.J. Breme, V. Biehl, J.A. Hielsen, *Metals and Implants*. Metals as Biomaterials, éd. Wiley and Sons, 1998: p. 36-71.
5. E. Chabault, *Nanofriction of UHMWPE on Gold and Cobalt- Chromium Alloys*. Rapport de PFE INSA Clemson University 2000.
6. H.F. Hildebrand, J.C. Hornez, *Biological Reponse and Biocompatibility*. Metals as Biomaterials, éd. Wiley and Sons, 1998: p. 265-290.
7. A. Michiardi, C. Aparicio, J.A. Planell, F.J. Gil, *Electrochemical behaviour of oxidized NiTi shape memory alloys for biomedical applications*. Surface & Coatings Technology 2007. 201: p. 6484-6488.
8. C. Kuphasuk, Y. Oshida, C. J. Andres, S. T. Hovijitra, M. T. Barco, D. T. Brown, *Electrochemical corrosion of titanium and titanium-based alloys*. J Prosthet Dent, 2001. 85: p. 195-202.
9. G. Nicolas, D. Geiger, C. Oddou, C. Hamonet, *Des fils d'alliages à mémoire de formes utilisés comme actionneurs d'orthèses dynamiques programmables* Proceedings du Colloque Mecano-Transduction 2000: p. 123-130.
10. S. Hiromoto, *Corrosion of Metallic Biomaterials in Cell Culture Environments* Electrochemical Society Interface, 2008. Summer: p. 41-44.
11. L.G. Griffith, *Polymeric biomaterials*. Acta mater. , 2000. 48: p. 263-277.
12. C. Piconi, G. Maccauro, *Zirconia as a ceramic biomaterial*. Biomaterials, 1999. 20: p. 1-25.
13. D. Rokusek, C. Davitt, A. Bandyopadhyay, S. Bose, H.L. Hosick, *Interaction of human osteoblasts with bioinert and bioactive ceramic substrates*. J Biomed Mater Res 2005. 75A: p. 588-594.
14. P. Ducheyne, Q Qui, *Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function*. Biomaterials, 1999. 20: p. 2287-2303.
15. J. Wang, P. Layrolle, M. Stigter, K. de Groot, *Biomimetic and electrolytic calcium phosphate coatings on titanium alloy: physicochemical characteristics and cell attachment*. Biomaterials 2004. 25: p. 583-592.
16. S. Levy, M. Van Dalen, S. Agonafer, W.O. Soboyejo, *Cell/surface interactions and adhesion on bioactive glass 45S5*. J Mater Sci: Mater Med 2007. 18: p. 89-102.
17. C.Y. Ning, Y.J. Wang, X.F. Chen, N.R. Zhao, J.D. Ye, G. Wu, *Mechanical performances and microstructural characteristics of plasma-sprayed bio-functionally gradient HA-ZrO<sub>2</sub>-Ti coatings*. Surface & Coatings Technology, 2005. 200: p. 2403 - 2408.
18. W. C. Callister, *Fundamentals of Mater. Sci. and Eng. 2nd edition*. Wiley & Sons, New York 2005.
19. M. Textor, C. Sittig, V. Frauchiger, S. Tosatti, D.M. Brunette, *Properties and Biological Significance of Natural Oxide Films on Titanium and Its Alloys*. In: Brunette PM, Tengvall P, Textor M, Thomsen P, editors. Titanium in medicine: material science, surface science, biological responses and medical applications. Heidelberg, Berlin: Springer, 2001: p. 172-230.
20. T. Eliades, *Passive films growth on titanium alloys: physicochemical and biological Considerations*. Int J Oral Maxillofac Implants, 1997. 12: p. 621-627.
21. J.C. Keller, C.M. Stanford, J.P. Wightman, R.A. Draughn, R. Zaharias *Characterization of titanium implant surfaces. III*. J Biomed Mater Res 1994. 28: p. 939-946.
22. T. Hanawa, M. Ota, *Characterization of surface film formed on titanium in electrolyte using XPS*. Appl Surf Sci, 1992. 55: p. 269-276.
23. D.C. Smith, S. Lugowski, A. McHugh, D. Deporter, P.A. Watson, M. Chipman, *Systemic metal ion levels in dental implant patients*. Int J Oral Maxillofac Implants, 1997. 12: p. 828-834.
24. M.F. Maitz, M.T. Pham, E. Wieser, I. Tsyganov, *Blood compatibility of titanium oxides with various crystal structure and element doping*. J Biomater Appl 2003. 17: p. 303-319.
25. D.F. Williams, *Definitions in biomaterials*, Amsterdam: Elsevier, 1987.
26. D.F. Williams, *The Williams dictionary of biomaterials*. . Liverpool: Liverpool University Press, 1999.
27. D.F. Williams, *On the mechanisms of biocompatibility*. Biomaterials, 2008. 29: p. 2941-2953.
28. L.L. Hench, E.C. Ethridge, *Adv. Biomed. Eng.*, 1975. 5: p. 35.

29. M.C. Garcia-Alonso, L. Saldana, G. Valles, J.L. Gonzalez-Carrasco, J. Gonzalez-Cabrero, M.E. Martinez, E. Gil-Garay, L. Munuera, *In vitro corrosion behaviour and osteoblast response of thermally oxidised Ti6Al4V alloy*. Biomaterials, 2003. 24: p. 19-26.
30. A. Bagno, C di Bello, *Surface treatments and roughness properties of Ti - based biomaterials*. Journal of Materials Science, 2004. 15: p. 935-949.
31. R.M. Pilliar, *Overview of surface variability of metallic endosseous dental implants: textured and porous surface-structured designs*, . Implant Dent 1998. 7: p. 305-314.
32. S.J. Xiao, G.K., M. Textor, *Biochemical modification of titanium surfaces* Titanium in Medicine (Brunette DM, Tengvall P, Textor M, Thomsen P. eds). 2001, Berlin: Springer-Verlag.
33. A. Wennerberg, T. Albrektsson, B. Andersson, J.J. Krol, *A histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants with three different surface topographies*. Clin Oral Implants Res, 1995. 6: p. 24-30.
34. H.J. Ronold, S.P. Lyngstadaas, J.E. Ellingsen, *Analysing the optimal value for titanium implant roughness in bone attachment using a tensile test*. Biomaterials 2003. 24: p. 4559-4564.
35. B. Feng, J. Weng, B.C. Yang, S.X. Qu, X.D. Zhang, *Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblast*. Biomaterials, 2003. 24: p. 4663-4670.
36. B.D. Boyan, S. Lossdörfer, L. Wang, G. Zhao, C.H. Lohmann, D.L. Cochran, Z. Schwartz, *Osteoblasts generate an osteogenic microenvironment when grown on surfaces with rough microtopographies*. European Cell and Materials, 2003. 6: p. 22-27.
37. A.L. Rosa, M.M. Beloti, *Effect of cpTi Surface Roughness on Human Bone Marrow Cell Attachment, Proliferation, and Differentiation*. Braz Dent J 2003. 14(1): p. 16-21.
38. B.D. Boyan, T.W. Hummert, D.D. Dean, Z. Schwartz, *Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response*. Biomaterials, 1996. 17: p. 137-146.
39. B. Baharloo, M. Textor, D.M. Brunette, *Substratum roughness alters the growth, area, and focal adhesions of epithelial cells, and their proximity to titanium surfaces*. Published online 27 May 2005 in Wiley InterScience ([www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)). DOI: 10.1002/jbm.a.30321, 2005.
40. A.K. Refai, M. Textor, D.M. Brunette, D. Waterfield, *Effect of titanium surface topography on macrophage activation and secretion of proinflammatory cytokines and chemokines*. Published online 7 June 2004 in Wiley InterScience ([www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)). DOI: 10.1002/jbm.a.30075, 2004.
41. L.G. Harris, L.M. Patterson, C. Bacon, I. ap Gwynn, R.G. Richards, *Assessment of the cytocompatibility of different coated titanium surfaces to fibroblasts and osteoblasts*. Published online 9 February 2005 in Wiley InterScience ([www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)). DOI: 10.1002/jbm.a.30276, 2005.
42. B.S. Park, S.J. Heo, C.S. Kim, J.-E. Oh, J.-M. Kim, G. Lee, W. H. Park, C.-P. Chung, B.-M. Min, *Effects of adhesion molecules on the behavior of osteoblast-like cells and normal human fibroblasts on different titanium surfaces*. J Biomed Mater Res, 2005. 74A: p. 640-651.
43. M. Jayaraman, U. Meyer, M. Bühner, U. Joos, H.P. Wiesmann *Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro* Biomaterials, 2004. 25: p. 625-631.
44. Z. Schwartz, C.H. Lohmann, J. Oefinger, L.F. Bonewald, D.D. Dean, B.D. Boyan, *Implant Surface Characteristics Modulate Differentiation Behavior Of Cells In The Osteoblastic Lineage*. Adv Dent Res, 1999. 13: p. 38-48.
45. G. Zhao, Z. Schwartz, M. Wieland, F. Rupp, J. Geis-Gerstorfer, D. L. Cochran, B. D. Boyan, *High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure*. J Biomed Mater Res 2005. 74A: p. 49-58.
46. R.E. Weiss, A.H. Reddi, *Appearance of fibronectin during the differentiation of cartilage, bone and bone marrow*. J Cell Biol, 1981. 88: p. 630-636.
47. B.S. Pearson, R.J. Klebe, B.D. Boyan, D. Moskowicz, *Comments on the clinical application of fibronectin in dentistry*. J Dent Res, 1988. 67: p. 515-517.
48. J.Y. Martin, Z. Schwartz, T.W. Hummert, D.M. Schraub, J. Simpson, J.Jr. Lankford, D.D. Dean, D.L. Cochran, B.D. Boyan, *Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63)*. J Biomed Mater Res, 1995. 29: p. 389-401.
49. K. Kieswetter, Z. Schwartz, T.W. Hummert, D.L. Cochran, J. Simpson, D.D. Dean, B.D. Boyan *Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells*. J Biomed Mater Res, 1996. 32: p. 55-63.
50. B.D. Boyan, J. Lincks, C.H. Lohmann, V.L. Sylvia, K.L. Cochran, C.R. Blanchard, D.D. Dean, Z. Schwartz, *Effect of surface roughness and composition on osteochondrocytes is dependent on cell maturation state*. Journal of Orthopaedic Research, 1999. 17: p. 446-457.
51. L. Ponsonnet, V. Comte, A. Othmane, C. Lagneau, M. Charbonnier, M. Lissac, N. Jaffrezic, *Effect of surface topography and chemistry on adhesion, orientation and growth of fibroblasts on nickel-titanium substrates*. Materials Science and Engineering C 2002. 21: p. 157-165.

52. E.T. den Braber, J.E. de Ruijter, L.A. Ginsel, A.F. von Recum, J.A. Jansen *Orientation of ECM protein deposition, fibroblast cytoskeleton, and attachment complex components on silicone microgrooved surfaces*. J Biomed Mater Res, 1998. 40: p. 291-300.
53. R. Hu, C.J. Lin, H.Y. Shi, *A novel ordered nano hydroxyapatite coating electrochemically deposited on titanium substrate*. J Biomed Mater Res 2007. 80A: p. 687-692.
54. M. Jager, C. Zilkens, K. Zanger, R. Krauspe, *Significance of Nano- and Microtopography for Cell-Surface Interactions in Orthopaedic Implants*. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2007. ID 69036,; p. 1-19.
55. T.J. Webster, C.E., R.H. Doremus, R.W. Siegel, R. Bizios, *Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics*. Biomaterials, 2000. 21: p. 1803-1810.
56. R. Stangl, B. Rinne, S. Kastl, C. Hendrich, *The Influence of Pore Geometry in Cp Ti Implants – A Cell Culture Investigation*. European Cell and Materials, 2001. 2: p. 1-9.
57. J.J. Klawitter, S.F. Hulbert, *Application of porous ceramics for the attachment of load-bearing orthopaedic applications*. J Biomed Mater Res, 1971. 2: p. 161-229.
58. J. Li, H. Liao, B. Fartash, L. Hermannsson, T. Johnsson *Surfact-dimpled commercially pure titanium implant and bone ingrowth*. Biomaterials, 1997. 18: p. 691-696.
59. C.A. Homsy, *Implant stabilization. Chemical and biochemical consideration*. Orthop Clin North Am 4, 1973: p. 295-311.
60. O. Zinger, G. Zhao, Z. Schwartz, J. Simpson, M. Wieland, D. Landolt, B. Boyan, *Differential regulation of osteoblasts by substrate microstructural features*. Biomaterials 2005. 26: p. 1837-1847.
61. J. Pan, H. Liao, C. Leygraf, D. Thierry, J. Li, *Variation of oxide films on titanium induced by osteoblast-like cell culture and the influence of an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pretreatment*. J Biomed Mater Res A, 1998. 40(2): p. 244 - 256.
62. X. Nie, E. I. Meletisa, J. C. Jianga, A. Leylandb, A. L. Yerokhinb, A. Matthews, *Abrasive wear/corrosion properties and TEM analysis of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> coatings fabricated using plasma electrolysis*. Surf Coat Technol, 2002. 149 (2-3): p. 245-251.
63. L. Zhu, X. Ye, G. Tang, N. Zhao, Y. Gong, Y. Zhao, J. Zhao, X. Zhang, *Corrosion test, cell behavior test, and in vivo study of gradient TiO<sub>2</sub> layers produced by compound electrochemical oxidation*. J Biomed Mater Res 2006. 78A: p. 515-522.
64. N. Hallab, K. Bundy, K. O'Connor, R. Clark, R. Moses, *Surface Charge, Biofilm Composition and Cellular Morphology as Related to Cellular Adhesion to Biomaterials*. IEEE, 1995
65. M. Lampin, R. Warocquier-Clerout, C. Legris, M. Degrange, M. F. Sigot-Luizard, *Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration*. J Biomed Mater Res, 1997. 36: p. 99-108.
66. L. Ponsonnet, K. Reybier, N. Jaffrezic, V. Comte, C. Lagneau, M. Lissac, C. Martelet, *Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour*. Materials Science and Engineering C 2003. 23: p. 551-560.
67. F. Rupp, L. Scheideler, N. Olshanska, M. de Wild, M. Wieland, J. Geis-Gerstorfer, *Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces*. J Biomed Mater Res 2006. 76A: p. 323-334.
68. E.M.C. X. Lima, W.J. da Silva, J.S. Moura, F.Faot. A.A.Del Bel Cury, *Evaluation of surface characteristics of Ti-6Al-4V and Tiltite alloys used for implant abutments*. Braz Oral Res, 2006. 20(4): p. 307-311.
69. B. Lassen, K. Holmberg, C. Brink, A. Carlen, J. Olsson, *Binding of salivary proteins and oral bacteria to hydrophobic and hydrophilic surfaces in vivo and in vitro*. Colloid Polym Sci, 1994. 272: p. 1143-1150.
70. S. Welin-Klingström, A. Askendal, H. Elwing, *Surfactant and protein interactions on wettability gradient surfaces*. J Colloid Interface Sci, 1993. 158: p. 188-194.
71. W. Zhou, X. Zhong, X. Wu, L. Yuan, Z. Zhao, H. Wang, Y. Xia, Y. Feng, J. He, W. Chen, *The effect of surface roughness and wettability of nanostructured TiO<sub>2</sub> film on TCA-8113 epithelial-like cells*. Surface & Coatings Technology, 2006. 200: p. 6155-6160.
72. L.V. Carlsson, T. Albertsson, C. Berman, *Bone response to plasma-cleaned titanium implants*. Int J Oral Maxillofac Implants, 1989. 4: p. 199-204.
73. K. Cai, J. Bossert, K.D. Jandt, *Does the nanometre scale topography of titanium influence protein adsorption and cell proliferation?* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2006. 49: p. 136-144.
74. A. Krajewski, A. Piancastelli, R. Malavolti, *Albumin adhesion on ceramics and correlation with their Z-potential*. Biomaterials, 1998. 19: p. 637 - 641.
75. V.E. Hendrich, *The surfaces of metal oxides*. Rep Prog Phys, 1985. 48: p. 1481-1541.
76. H.P. Boehm, *Acidic and basic properties of hydroxylated metal oxide surfaces*. Discuss Faraday Soc, 1971. 52: p. 264-277.

77. M.P. Casaletto, G.M. Ingo, S. Kaciulis, G. Mattogno, L. Pandol, G. Scavia, *Surface studies of in vitro biocompatibility of titanium oxide coatings*. Applied Surface Science 2001. 172 p. 167-177.
78. G. Giavaresi, R. Giardino, L. Ambrosio, G. Battiston, R. Gerbasi, M. Fini, L. Rimondini, P. Torricelli, *In vitro biocompatibility of titanium oxide for prosthetic devices nanostructured by low pressure metal-organic chemical vapor deposition*. The International Journal of Artificial Organs 2003. 26(8): p. 774-780
79. G. Giavaresi, L. Ambrosio, G.A. Battiston, U. Casellato, R. Gerbasi, M. Finia, Nicol"o Nicoli Aldini, L. Martini, L. Rimondini, R. Giardino, *Histomorphometric, ultrastructural and microhardness evaluation of the osseointegration of a nanostructured titanium oxide coating by metal-organic chemical vapour deposition: an in vivo study*. Biomaterials 2004. 25 p. 5583–5591.
80. H.H. Huang, C.T. Ho, T.H. Lee, T.L. Lee, K.K. Liao, F.L. Chen, *Effect of surface roughness of ground titanium on initial cell adhesion*. Biomolecular Engineering, 2004. : p. 93-97.
81. E. Eisenbarth, P. Linez, V. Biehl, D. Velten, J. Breme, H.F. Hildebrand, *Cell orientation and cytoskeleton organisation on ground titanium surfaces*. Biomolecular Engineering 2002. 19: p. 233-237.
82. T.P. Kunzler, T. Drobek, M. Schuler, N.D. Spencer, *Systematic study of osteoblast and fibroblast response to roughness by means of surface-morphology gradients*. Biomaterials 2007. 28: p. 2175-2182.
83. P. Linez-Bataillon, F. Monchau, M. Bigerelle, H.F. Hildebrand, *In vitro MC3T3 osteoblast adhesion with respect to surface roughness of Ti6Al4V substrates* Biomolecular Engineering, 2002. 19 p. 133-141.
84. F. Lindberg, J. Heinrichs, F. Ericson, P. Thomsen, H. Engqvist, *Hydroxylapatite growth on single-crystal rutile substrates*. Biomaterials 2008. 29: p. 3317-3323.
85. J.M. Fernandez-Pradas, L. Cleries, E. Martinez, G. Sardin, J. Esteve, J.L. Morenza *Influence of thickness on the properties of hydroxyapatite coatings deposited by KrF laser ablation*. Biomaterials, 2001. 22: p. 2171-2175.
86. W.J. Lo, D.M. Grant, M.D. Ball, B.S. Welsh, S.M. Howdle, E.N. Antonov, V.N. Bagratashvili, V.K. Popov *Physical, chemical, and biological characterization of pulsed laser deposited and plasma sputtered hydroxyapatite thin films on titanium alloy*. J Biomed Mater Res, 2000. 50: p. 536-545.
87. M.D. Ball, S. Downes, C.A. Scotchford, E.N. Antonov, V.N. Bagratashvili, V.K. Popov, W.J. Lo, D.M. Grant, S.M. Howdle *Osteoblast growth on titanium foils coated with hydroxyapatite by pulsed laser ablation*. Biomaterials, 2001. 22: p. 337-347.
88. F. Lusquinos, A. De Carlos, J. Pou, J.L. Arias, M. Boutinguiza, B. Leon, M. Perez-Amor, F.C. Driessens, K. Hing, I. Gibson, S. Best, W. Bonfield *Calcium phosphate coatings obtained by Nd: YAG laser cladding: physicochemical and biologic properties*. J Biomed Mater Res, 2003. 64A: p. 630-637.
89. Y.X. Leng, N. Huang, P. Yanga, J.Y. Chen, H. Sun, J. Wang, G.J. Wan, X.B. Tian, and L.P.W. R.K.Y. Fu, P.K. Chu, *Structure and properties of biomedical TiO<sub>2</sub> films synthesized by dual plasma deposition*. Surface and Coatings Technology, 2002. 156: p. 295-300.
90. J.Y. Lim, M.C. Shaughnessy, Z. Zhou, H. Noh, E.A. Vogler, H.J. Donahue, *Surface energy effects on osteoblast spatial growth and mineralization*. Biomaterials, 2008. 29: p. 1776-1784.
91. M. Morra, C. Cassinelli, G. Cascardo, P. Cahalan, L. Cahalan, and R.G. M. Fini, *Surface engineering of titanium by collagen immobilization. Surface characterization and in vitro and in vivo studies*. Biomaterials 2003. 24: p. 4639–4654.
92. B.O. Aronsson, J. Lausmaa, B. Kasemo *Glow discharge plasma treatment for surface cleaning and modification of metallic biomaterials*. J Biomed Mater Res, 1997. 35: p. 49-73.
93. L. Sun, C.C. Berndt, K.A. Gross, A. Kucuk *Material fundamentals and clinical performance of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings: a review*. J Biomed Mater Res, 2001. 58: p. 570-592.
94. L.H. Li, Y.M. Kong, H.W. Kim, Y.W. Kim, H.E. Kim, S.J. Heo, J.Y. Koak, *Improved biological performance of Ti implants due to surface modification by micro-arc oxidation*. Biomaterials 2004. 25: p. 2867-2875.
95. C. Chen, Q. Dong, H. Yu, X. Wang, D. Wang, *Microstructure of Porous TiO<sub>2</sub> Coating on Pure Ti by Micro-arc Oxidation*. Advanced Engineering Materials, 2006. 8(8): p. 754-759.
96. F. Rupp, L. Scheideler, D. Rehbein, D. Axmann, J. Geis - Gerstorfer, *Roughness induced dynamic changes of wettability of acid etched titanium implant modification*. Biomaterials, 2004. 25: p. 1429 - 1438.
97. T. Kokubo, H.M. Kim, M. Kawashita, T. Nakamura, *Bioactive metals: preparation and properties*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2004. 15: p. 99-107.
98. A. Göransson, E. Jansson, P. Tengvall, A. Wennerberg, *Bone formation after 4 weeks around blood-plasma-modified titanium implants with varying surface topographies: an in vivo study*. Biomaterials, 2003. 24,: p. 197-205.



- 
99. Y.-T. Sul, *The significance of the surface properties of oxidized titanium to the bone response: special emphasis on potential biochemical bonding of oxidized titanium implant*. Biomaterials, 2003. 24: p. 3893–3907.
  100. E. Eisenbarth, D. Velten, K. Schenk-Meuser, P. Linez, V. Biehl, H. Duschner, J. Breme, H. Hildebrand, *Interactions between cells and titanium surfaces*. Biomolecular Engineering 2002. 19: p. 243-249.
  101. J. Takebe, S. Ito, C.M. Champagne, L.F. Cooper, K. Ishibashi, *Anodic oxidation and hydrothermal treatment of commercially pure titanium surfaces increases expression of bone morphogenetic protein-2 in the adherent macrophage cell line J774A.1*. J Biomed Mater Res, 2007. 80A: p. 711-718.
  102. K. Anselme, M. Biggerelle, *Statistical demonstration of the relative effect of surface chemistry and roughness on human osteoblast short term adhesion*. J Mater Sci: Mater Med, 2006. 17: p. 471-479.
  103. D.O. Meredith, L. Eschbach, M.A. Wood, M.O. Riehle, A.S.G. Curtis, R.G. Richards, *Human fibroblast reactions to standard and electropolished titanium and Ti–6Al–7Nb, and electropolished stainless steel*. Published online 17 August 2005 in Wiley InterScience ([www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)). DOI: 10.1002/jbm.a.30457, 2005.
  104. I. Piwonski, A. Ilik, *Vapor phase modification of sol–gel derived titania (TiO<sub>2</sub>) surfaces*. Applied Surface Science, 2006. 253: p. 2835-2840.
  105. A. Bagnò, A. Piovan, M. Dettin, A. Chiarion, P. Bruno, R. Gambaretto, G. Fontana, C. Di Bello, G. Palù, I. Castagliuolo, *Human osteoblast-like cell adhesion on titanium substrates covalently functionalized with synthetic peptides*. Bone, 2007. 40: p. 693-699.

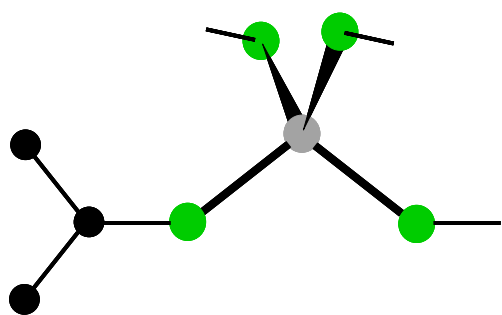
## Chapitre II. Préparation et caractérisation des films de TiO<sub>2</sub>

Chapitre II – Préparation et caractérisation des films de TiO<sub>2</sub>2.1. Préparation des films minces de TiO<sub>2</sub>

## 2.1.1. Préparation par MOCVD

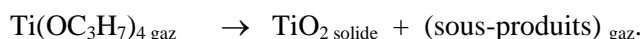
## 2.1.1.1. Le précurseur

Le précurseur moléculaire métal-organique utilisé dans cette étude est le tétra-*iso*-propoxyde de titane (TTIP) (Figure 2.1). D'une manière générale, c'est le précurseur le plus utilisé pour le dépôt de TiO<sub>2</sub> par la méthode MOCVD.

	Formule	Ti[OCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] <sub>4</sub>
	Masse molaire	284,2
	Température d'ébullition	91,3°C / 5 torr 50°C / 1 torr
	Densité à 25°C	0,995
	Viscosité à 15°C (cp)	2,11 – 2,29

**Figure 2.1.** Propriétés physico-chimiques du TTIP et schéma de sa structure moléculaire montrant son caractère monomère et la coordination tétraédrique du titane (gris) par les 4 atomes d'oxygène (vert).

Dans les conditions normales, le TTIP est un liquide incolore. Sensible à l'humidité, il doit être manipulé sous atmosphère inerte. Son introduction dans le saturateur se fait donc en boîte à gants sous argon. Une fois dans le saturateur sous atmosphère inerte, il est stable et ne se polymérise pas. On peut le considérer comme un précurseur de type *source unique* car son emploi ne nécessite pas de source supplémentaire d'oxygène pour la formation de l'oxyde de titane. La réaction globale de formation du dépôt de TiO<sub>2</sub> s'écrit :



Les sous-produits de décomposition ne sont pas nocifs.

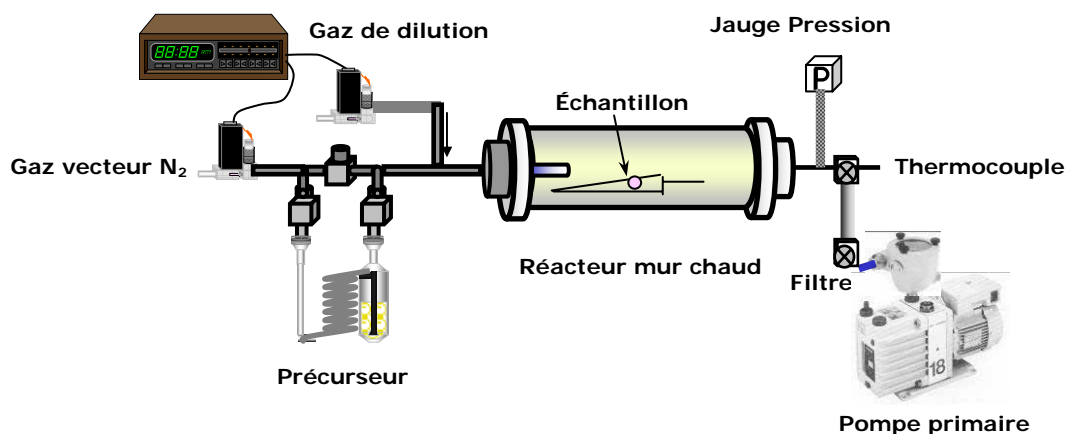
## 2.1.1.2. Le dispositif expérimental

Les dépôts ont été réalisés dans l'équipe CVD du CIRIMAT à Toulouse. Le dispositif construit au laboratoire est représenté sur la Figure 2.2. Le *réacteur à mur chaud* est composé d'un tube de quartz de diamètre interne 45 mm, long de 70 cm (35 cm dans la zone de chauffage), placé dans un four cylindrique horizontal. La température de réaction est contrôlée par un thermocouple de type K

placé au voisinage immédiat du porte échantillon. Le profil thermique du four a été établi pour les conditions les plus usuelles de pression totale, de débit gazeux et température. Ce profil permet de connaître la température du substrat suivant sa position dans le réacteur.

Le TTIP est introduit dans un *saturateur*, constitué d'un bulleur chauffé par un bain d'eau thermostaté. La température du bain fixe la tension de vapeur du TTIP. Le saturateur est équipé d'un *by-pass* qui permet au gaz vecteur soit de le contourner, soit de le traverser entraînant ainsi par barbotage les vapeurs du précurseur vers le réacteur.

De l'azote (Air Products, pureté 99,9992 %) est utilisé comme gaz vecteur et comme gaz de dilution. Les débits du gaz vecteur et du gaz de dilution sont régulés par des *débitmètres massiques* étalonnés au préalable. Deux *lignes d'azote* parviennent donc à l'entrée du réacteur : la ligne du gaz vecteur et la ligne du gaz de dilution. La première passe par le générateur de vapeur de TTIP. D'un débit faible, elle est équipée d'un débitmètre dans la gamme 0-75 sccm. La seconde arrive directement à l'entrée du réacteur. D'un débit beaucoup plus élevé, elle est équipée d'un débitmètre dans la gamme 0-575 sccm, et permet d'ajuster la vitesse de passage de la phase vapeur dans le réacteur et sa concentration ou fraction molaire en précurseur.



**Figure 2.2.** Schéma du montage de MOCVD

Afin d'éviter un effet de paroi froide qui modifierait la tension de vapeur choisie, les lignes d'amenée des gaz vers le réacteur sont chauffés par des *cordons chauffants* à une température supérieure d'environ  $20^\circ\text{C}$  à la température de vaporisation du précurseur.

Les gaz sont évacués de l'enceinte réactionnelle à l'aide d'une pompe primaire (à palettes) munie de deux filtres à particules. La pression est régulée au moyen d'une vanne électromagnétique de type papillon située à l'entrée de la pompe. Le vide limite de l'installation, de l'ordre de  $10^{-4}$  torr, est mesuré à l'aide d'une jauge Pirani.

### 2.1.1.3. Protocole expérimental

**Préparation des substrats** - Les substrats utilisés au cours de cette étude sont des disques de titane (pureté 99,6%, Good Fellow Ltd.) et des plaquettes de silicium monocristallin orienté (100). Pour que le dépôt soit bien homogène et adhérent, le substrat doit être débarrassé des impuretés (débris physiques, traces grasses) provenant des manipulations auquel il a été soumis.

Les substrats de Si(100) ont été dégraissés par immersion dans du trichloréthylène bouillant pendant 5 minutes, puis dans de l'acétone bouillant pendant 10 minutes et finalement dans de l'eau pure bouillante pendant 10 minutes, avant d'être rincés à l'eau dé-ionisée et séchés dans un courant d'argon sec.

Les substrats de titane sont sous une forme de disques de 10 mm de diamètre, épais d'environ 1 mm. Une fois tronçonnés, ils ont été polis à l'aide de papier SiC. Pour un polissage jusqu'à la granulométrie 4000, le protocole est le suivant :

- papier 320, environ 1 minute, sur chaque face, sans appuyer ;
- papier 600, environ 2 minutes, sur chaque face, sans appuyer, pour uniformiser la surface ;
- papier 1000, environ 2 minutes sur la face sur laquelle doit être fait le dépôt, appuyer normalement ;
- papier 1000, environ 2 minutes, appuyer normalement ;
- papier 1200, environ 2 minutes, appuyer normalement ;
- papier 2400, environ 4 minutes, polissage dans deux directions, au début parallèlement aux rayures, puis perpendiculairement, sans appuyer ;
- papier 4000, environ 4 minutes, polissage dans deux directions, sans appuyer.

Il faut prendre soin de polir légèrement, de la même manière pour tous les échantillons, en ayant soin de garder la même direction de rayure d'un papier SiC à l'autre. Le polissage est arrêté au papier de granulométrie correspondant à la rugosité désirée.

Une fois polis, les substrats en titane ont été nettoyés dans de l'acétone sous vibration ultrasonique pendant 10 minutes, puis dans de l'alcool bouillant pendant 10 minutes, enfin rincés à l'eau dé-ionisée et séchés dans un courant d'argon.

**Description d'une expérience de dépôt par MOCVD** - Les substrats à revêtir de  $\text{TiO}_2$  sont disposés sur un porte échantillon incliné et placés dans la zone isotherme du réacteur, à une distance bien repérée de l'entrée du réacteur. Une fois le réacteur fermé hermétiquement, on établit un vide primaire. Les lignes transportant les gaz vers le réacteur sont chauffées à une température supérieure d'environ 20°C à celle du bain thermostaté du précurseur. Les vannes d'admission des deux lignes d'azote sont ouvertes. Le gaz vecteur est admis à travers la ligne qui court-circuite le saturateur. Lorsque les débits, la pression totale et les températures de consigne (température du précurseur et température dépôt) sont stabilisées, le gaz vecteur est admis à buller dans le saturateur pour introduire

le précurseur dans le réacteur. Ceci marque le début du processus de dépôt. Pendant toute la durée du dépôt, les températures, la pression et les débits sont maintenus à des valeurs constantes.

On arrête le dépôt en shuntant le bulleur et en éteignant le four. On rétablit la pression atmosphérique dans le bulleur. Le gaz de dilution passe encore une demi-heure pour assurer l'évacuation des sous-produits. On laisse tout le système se refroidir avant de sortir les échantillons.

**Conditions typiques de dépôt** - Le Tableau 2.1 présente les domaines de valeur des paramètres expérimentaux des dépôts CVD réalisés au cours de ce travail. L'ensemble des dépôts est détaillé dans le Tableau de l'Annexe 1.

**Tableau 2.1.** Conditions opératoires typiques de préparation des films de TiO<sub>2</sub> par MOCVD

Pression totale (torr)	1 - 20
Température de dépôt (°C)	300 - 600
Débit gaz vecteur (N <sub>2</sub> , sccm)	15 - 75
Débit total de gaz (N <sub>2</sub> , sccm)	595 - 650
Température du précurseur (°C)	25 - 65
Fraction molaire de TTIP (10 <sup>-6</sup> )	76 - 9000
Durée du dépôt (min)	25 - 500
Substrat	disques de titane, plaquettes de silicium <100>

Les coefficients de l'équation de Clausius-Clapeyron qui rend compte de la variation de la pression de vapeur saturante de TTIP en fonction de la température ont été déterminés par la méthode d'entraînement par Duminica et al [1]

$$\log P_{prec} \text{ (torr)} = 9,465 - \frac{3222}{T(K)}.$$

Une fois calculée la pression de vapeur saturante à une température fixée, la fraction molaire du précurseur est calculée à l'aide de la formule :

$$\chi_{prec} = \frac{P_{prec} \cdot Q_{prec}}{P_{reacteur} \cdot Q_{N_2}}.$$

$P_{prec}$  désigne la pression de vapeur saturante,  $P_{reacteur}$ , la pression dans l'enceinte du réacteur,  $Q_{prec}$ , le débit de gaz vecteur dans le réacteur et  $Q_{N_2}$ , le débit total de gaz (vecteur + dilution).

### 2.1.2. Préparation par anodisation du titane

Les échantillons de titane utilisés pour le traitement par anodisation ont été soumis à la procédure de nettoyage décrite au paragraphe 2.1.1.3. L'anodisation du titane a été réalisée à 20°C, dans une solution aqueuse à 30g/l d'acide orthophosphorique, sous une tension de 30V, pendant 15

minutes, en utilisant une source de courant continu. L'anode était constituée de l'échantillon de titane et la cathode d'une barre de graphite. Une fois traité, l'échantillon est soumis à un bon rinçage avec de l'eau déionisée.

## 2.2. Caractérisation physico-chimique des dépôts

Les techniques présentées ici ont permis de caractériser la morphologie, la cristallinité, la composition allotropique et les propriétés de surface des couches minces de TiO<sub>2</sub> et leur comportement en solution physiologique simulée. Les études électrochimiques ont été réalisées au Département de Chimie Générale de l'Université Polytechnique de Bucarest. Les cultures cellulaires et leur caractérisation ont été réalisées au Département de Biochimie et Biologie Moléculaire de la Faculté de Biologie de l'Université de Bucarest. Les autres techniques ont été mises en oeuvre au CIRIMAT à l'Institut National Polytechnique de Toulouse.

### 2.2.1. Diffraction des rayons X (DRX)

**Principe** - La technique de diffraction des rayons X permet de connaître l'état de cristallisation du dépôt et d'identifier les phases cristallisées présentes dans un échantillon. Les diffractogrammes enregistrés pour les échantillons sont comparés à ceux de composés références, rassemblés le fichier JCPDS.

**Appareillage** -Les diffractogrammes ont été enregistrés sur un diffractomètre SEIFERT XRD 3000 TT, équipé d'un monochromateur en graphite, placé entre l'échantillon et le détecteur (montage arrière). L'échantillon plan est immobilisé en position horizontale sur un porte échantillon. Ce diffractomètre offre deux configurations d'enregistrement :

- *thêta/thêta* ( $\theta$ - $\theta$ ) : les bras de la source et du détecteur se déplacent l'un vers l'autre, en tournant du même angle par rapport à la surface de l'échantillon. Cette configuration est utilisée pour des dépôts suffisamment épais pour que la pénétration dans le substrat ne soit pas gênante. Elle permet de repérer l'éventuelle orientation préférentielle d'une famille de plans réticulaires parallèlement à la surface du dépôt et d'analyser quantitativement un mélange de phases s'il n'est pas texturé.

- *incidence rasante* : le faisceau incident reste fixe en faisant un angle très petit (de quelques dixièmes de degrés à quelques degrés) avec la surface de l'échantillon. Seul le détecteur se déplace pour balayer angulairement les cônes de diffraction. Cette configuration est utilisée pour des films peu épais, car elle permet au faisceau incident de parcourir un chemin important dans le dépôt et de minimiser sa pénétration dans le substrat.

La source de rayons X est une anticathode de cuivre ( $\lambda_{CuK\alpha} = 1,5418 \text{ \AA}$ ). La divergence du faisceau est limitée à  $0,4^\circ$ . Les diffractogrammes ont été enregistrés entre  $10^\circ$  et  $50^\circ$  (voire  $90^\circ$  dans

certain cas) en  $\theta$ , en utilisant une incidence  $\Omega = 2^\circ$  pour les montages en incidence rasante. Les diagrammes expérimentaux ont été traités par le logiciel ANALYZE.

### 2.2.2. Microscopie électronique à balayage (MEB)

**Principe** - La microscopie électronique à balayage (MEB) permet de réaliser des observations morphologiques, de distinguer détails de l'ordre du centième à nanomètre, grâce à la profondeur de champ. Les images qui résultent ont une qualité de définition tridimensionnelle. Sous l'impact du faisceau d'électrons, il y a rétro diffusion d'électrons du faisceau incident, émission d'électrons secondaires de faible énergie, provenant de l'ionisation des atomes de l'échantillon, et émission d'électrons Auger et de rayons X caractéristiques des éléments présents dans l'échantillon. Le détecteur du MEB récupère un mélange en proportion variable d'électrons secondaires et d'électrons rétro diffusés, proportion dépendant de l'énergie primaire, de la distance échantillon-objectif, de l'angle d'incidence du faisceau primaire et du matériau observé. Les électrons secondaires permettent de distinguer les détails de la topographie de surface de l'échantillon. Les électrons rétro diffusés permettent d'en observer le contraste chimique.

**Tableau 2.2.** Paramètres de travail du microscope électronique en balayage (MEB) - LEO-435VP

Tension d'accélération (kV)	15
Courant de sonde (pA)	75-160
Distance de travail (mm)	11-18
Agrandissement	X15 – X15000
Immobilisation sur port échantillon	Colle au graphite
Filament	tungstène hairpin filament
Type d'échantillon analyse	disques de titane, silicium

**Appareillage** - L'appareil utilisé est un microscope électronique à balayage LEO-435. Les observations ont porté sur la surface des dépôts et sur des coupes transverses. Ces coupes, faciles à réaliser sur les dépôts sur plaquette de silicium, permettent de mesurer l'épaisseur des dépôts et d'observer leur morphologie de croissance. Les paramètres de travail sont listés dans le Tableau 2.2.

### 2.2.3. Mesure de l'épaisseur des films déposés sur titane

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour mesurer l'épaisseur des dépôts. Dans tous les cas, il s'agit d'une opération délicate à cause des limitations imposées par chaque méthode.

#### 2.2.3.1. Epaisseur déduite de la prise de masse

Une première estimation peut être déduite de la prise de masse du substrat : le substrat est pesé avant et après le dépôt. Connaissant la masse d'oxyde déposé ( $m$ ), la surface du substrat ( $A$ ) et la masse volumique de l'oxyde de titane ( $\rho$ ), on obtient une première estimation pour l'épaisseur du film :

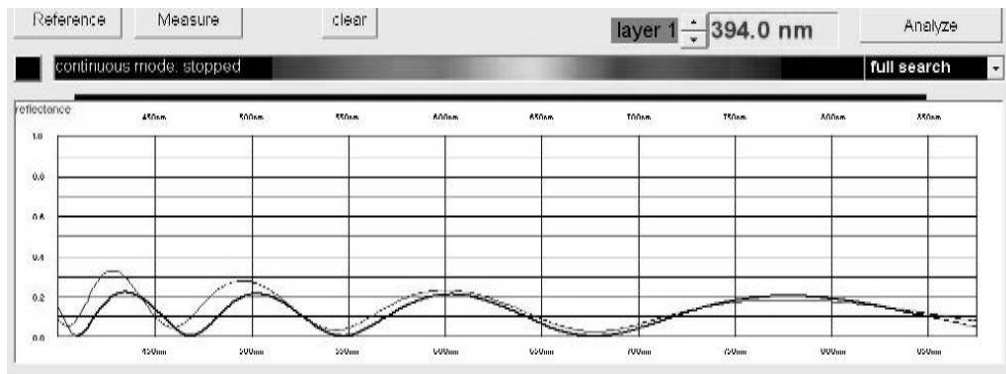


$$\text{épaisseur} = \frac{m}{A \cdot \rho}$$

Cette méthode ne tient pas compte de la porosité du film, ni de la quantité de film déposé sur le pourtour du substrat. De plus, ne connaissant pas précisément la composition du dépôt, on lui attribue une masse volumique  $\rho = 4 \text{ g/cm}^3$ , moyenne entre les masses volumiques de l'anatase ( $3,89 \text{ g/cm}^3$ ) et du rutile ( $4,27 \text{ g/cm}^3$ ).

### 2.2.3.2. Mesure de l'épaisseur par réflectométrie

**Principe** - Par réflectométrie, on mesure la quantité de lumière réfléchiée par un film mince sur un domaine étendu de longueur d'onde, lorsque le faisceau incident est normal à la surface du film. Les variations de la réflectance avec la longueur d'onde présentent une amplitude et une périodicité qui dépendent de l'épaisseur du film, de ses constantes optiques et de quelques autres paramètres tels que la rugosité. Une fois ces variations mesurées, on recherche la courbe calculée qui en rend le mieux compte. Cette courbe est calculée à l'aide d'un modèle dans lequel on introduit les indices optiques  $n$  et  $k$  et qui traite l'épaisseur comme une variable ajustable. L'épaisseur retenue est celle pour laquelle on observe le meilleur accord entre la courbe enregistrée et la courbe calculée (Figure 2.3) L'épaisseur du film ne doit pas dépasser 2 à 3  $\mu\text{m}$ . Au-delà, le film est trop opaque et donne un signal aplati. La rugosité du film et/ou du substrat peut également être un facteur limitant.



**Figure 2.3.** Spectre de réflectance expérimental (trait fin) et calculé (trait épais) pour un échantillon un film de TiO<sub>2</sub> sur titane.

**Appareillage** - L'épaisseur des couches de TiO<sub>2</sub> préparées par MOCVD sur substrat de titane et sur substrat de silicium a été mesurée par réflectométrie à l'aide d'un appareil NC-UV-VIS de marque Ocean Optics et du logiciel Nanocalc. Les mesures ont été effectuées sur le domaine de longueur d'onde 575 - 875 nm. Un disque de Ti non traité, poli 4000, a servi de référence.

#### 2.2.4. Mesure de la rugosité par interférométrie optique

**Principe** - L'interférométrie est une technique dans laquelle la différence de trajet optique entre une référence interne et l'échantillon génère des franges d'interférence. Le traitement de ces franges permet d'obtenir une image agrandie de l'échantillon. Le faisceau lumineux issu de la source est partagé en deux, un faisceau allant vers la référence interne et l'autre vers l'échantillon. Après réflexion les faisceaux se recombinaient dans l'interféromètre en formant des franges blanches et noires. L'interférogramme, enregistré par une caméra CCD, est ensuite traité par ordinateur pour restituer une image 3D de la surface de l'échantillon. Nous avons utilisé cette technique pour visualiser et mesurer la rugosité des dépôts.

**Appareillage** - La rugosité de la surface des échantillons de titane nu et recouverts de  $\text{TiO}_2$  a été mesurée à l'aide d'un interféromètre optique MetroProTM, Zygo New View 100. La méthode est non destructive, rapide et permet d'accéder à la rugosité arithmétique  $R_a$  et à la rugosité quadratique moyenne  $R_q$ .

#### 2.2.5. Mesure de l'énergie de surface par la technique du mouillage

**Principe** - Le mouillage est une technique qui donne des informations sur les propriétés de la première couche moléculaire d'une surface solide. Le principe de cette méthode consiste à mesurer l'angle fait par la tangente du profil d'une goutte déposée sur le substrat avec la surface du substrat. Cette technique peut donner une information qualitative ou quantitative sur l'énergie de la surface :

- en utilisant une goutte d'eau, on peut déduire le caractère hydrophobe (grand angle, faible énergie de surface) ou hydrophile (petit angle, grande énergie de surface) de la surface ;
- en utilisant plusieurs liquides de référence différents, on peut calculer l'énergie libre de la surface et les composantes polaires ou apolaires de cette énergie, en utilisant le modèle de Owens Wendt [2] [3]

**Appareillage** - L'angle de goutte a été mesuré avec un équipement DIGIDROP Contact Angle Meter (GBX Scientific Instruments). Pour chaque échantillon, l'angle de goutte a été mesuré en trois points de la surface, en y déposant 10  $\mu\text{l}$  d'eau distillée. L'angle a été mesuré juste après le dépôt de la goutte, en utilisant un objectif Nikon et le logiciel Windrop.

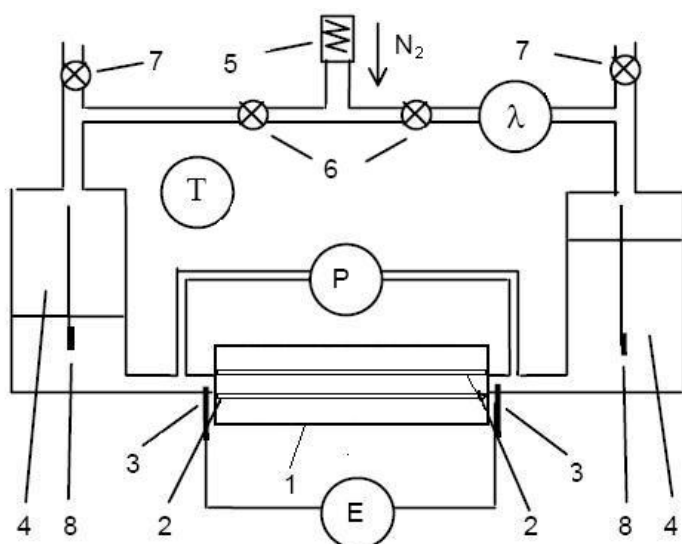
Pour les mesures quantitatives de l'énergie de surface, l'angle de goutte a été mesuré de la même manière pour trois liquides : l'eau, le formamide et le diiodométhane.

#### 2.2.6. Mesure du potentiel zêta de surface

**Principe** - Cette technique permet de mesurer les charges de surface. Pour un dépôt plan, l'échantillon est constitué de deux dépôts se faisant face à une distance de l'ordre du dixième de millimètre. L'échantillon est placé dans une cellule spécifique qui permet à un électrolyte de s'écouler entre les deux dépôts par application d'une différence de pression. La mesure du potentiel électrique

aux bornes de la cellule de mesure en fonction de la différence de pression permet de déterminer le potentiel d'écoulement et d'en déduire le potentiel zêta de surface.

**Appareillage** - Le potentiel d'écoulement a été enregistré avec un dispositif ZETACAD (CAD Inst. France). L'appareil est équipé de deux électrodes Ag/AgCl placées à l'entrée et à la sortie de la cellule, et connectées à un multimètre Keithley, qui mesure la différence de potentiel développée lors du passage de la solution entre les deux surfaces.

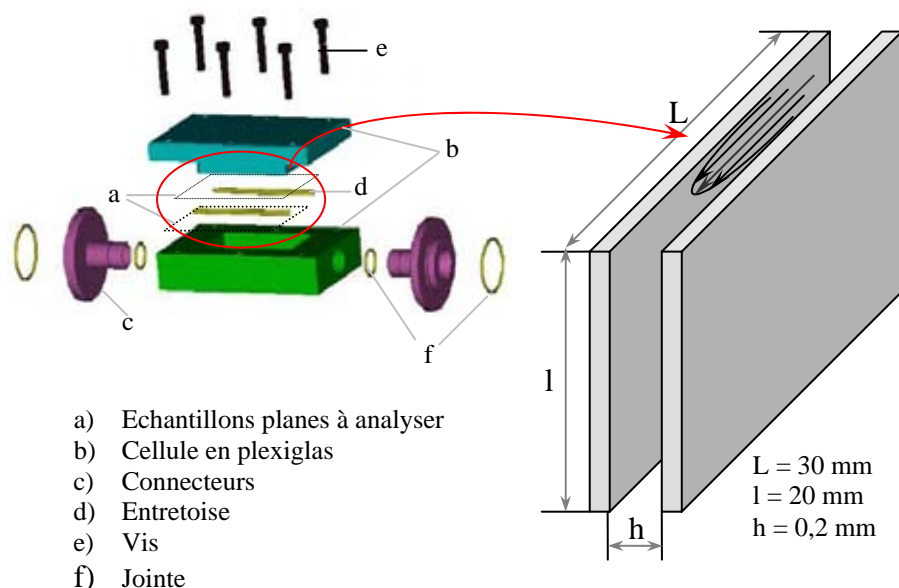


**Figure 2.4..** Schéma du montage de mesure du potentiel  $\xi$ .

1. cellule en plexiglas
2. échantillons plans
3. électrodes Ag/AgCl
4. réservoirs de la solution d'électrolyte
5. vanne d'entrée de  $\text{N}_2$
6. vannes pour diriger  $\text{N}_2$
7. vanne d'aération
8. capteurs de niveau

Le schéma de l'équipement est présenté sur la Figure 2.4. La cellule est équipée de deux électrodes Ag/AgCl placées à l'entrée et à la sortie de la zone d'écoulement de l'électrolyte dans l'échantillon (canal d'écoulement) et connectées à un multimètre pour mesurer la différence de potentiel développée dans la solution sur la longueur de l'échantillon. Cette différence de potentiel est enregistrée alternativement pour les deux directions d'écoulement, pour des valeurs de pression qui augmentent progressivement de 10 à 400 mbar. Le logiciel de pilotage permet de contrôler les paramètres suivants : la pression de départ, la durée de maintien de cette pression, le saut de pression, la périodicité d'enregistrement du potentiel et de la pression. La conductivité électrique de la solution ( $\lambda$ ) et la température (T) sont mesurées en permanence.

Pour les mesures de potentiel d'écoulement on a utilisé une cellule rectangulaire montrée à la Figure 2.5, adaptée spécialement aux surfaces planes. Le canal d'écoulement résulte de l'assemblage face à face de deux échantillons plans, identiques, revêtus ou non d'un dépôt, et maintenus séparés par deux entretoises latérales en téflon. La distance entre les deux surfaces dont on veut mesurer la charge est de  $200\mu\text{m}$ , fixée par l'épaisseur des entretoises. L'épaisseur d'un échantillon est de  $280\mu\text{m}$ . Avant chaque mesure, les échantillons sont maintenus quelques heures dans la solution dans laquelle les mesures seront faites. Pendant la mesure, le liquide était poussé entre les deux surfaces à l'aide d'azote sec. L'utilisation d'azote assure la stabilité du pH de la solution sur une longue période et évite les problèmes causés par le dioxyde de carbone atmosphérique.



**Figure 2.5.** Schéma de la cellule rectangulaire utilisée pour mesurer le potentiel zêta (à gauche) et des deux plaques constituant l'échantillon (à droite)

Les mesures ont été effectuées à  $26 \pm 3^\circ\text{C}$ , pour différents gradients de pression et pour les deux sens d'écoulement de l'électrolyte. Au moins 250 points expérimentaux (E *versus* P) ont été enregistrés pour chaque mesure.

### 2.2.7. Mesure de l'adhérence par la technique du Scratch test

**Principe** - Ce test permet de qualifier les systèmes substrat-dépôt par des d'informations quantitatives fournies par le couplage de méthodes complémentaires (émission acoustique, frottement.). La technique consiste à réaliser une rayure sur un échantillon en déplacement sous une pointe. Cette pointe est en diamant. Elle appuie sur la surface du dépôt sous l'effet d'une charge qui, au cours du déplacement, est soit constante, soit progressive, soit incrémentale. L'altération du dépôt peut être observée optiquement. Cette analyse optique est corrélée aux informations enregistrées par différents capteurs placés sur le système : capteur d'émission acoustique, capteur de friction, capteur de profondeur de pénétration. Ces diagnostics complémentaires délivrent une signature unique des propriétés adhésives du revêtement.

**Appareillage** - L'appareil utilisé est un dispositif REVETEST<sup>®</sup> Scratch Testeur CSM Instruments, équipé d'un indenteur Rockwell C représenté par un diamant conique d'angle  $120^\circ$  et de  $200 \mu\text{m}$  de rayon de courbure au sommet. L'intervalle de charge appliqué est de 1N à 30N, avec une vitesse de charge de 10N/min et une vitesse d'avance de 1mm/min.

### 2.2.8. Etude de la résistance à la corrosion

L'étude de la résistance à la corrosion a été effectuée dans le Département de Chimie Générale de l'Université Politehnica de Bucarest.

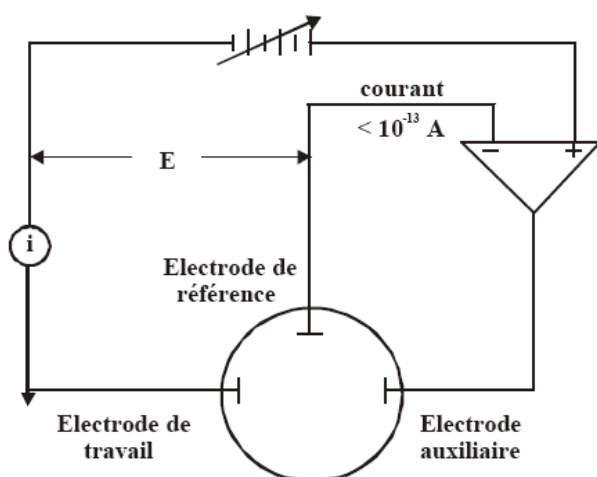
### 2.2.8.1. Potentiel d'électrode en circuit ouvert (OCP)

**Principe** - Cette technique permet de suivre l'évolution dans le temps du potentiel de l'échantillon (électrode de travail) en circuit ouvert (OCP) par rapport à une électrode de référence. L'échantillon est maintenu en immersion dans l'électrolyte et le potentiel libre d'électrode est mesuré en fonction du temps. Le *potentiel d'abandon* ( $E_a$ ) est déterminé à partir des courbes de suivi du potentiel en fonction du temps. Ce potentiel est une caractéristique de la modification de l'interface entre un métal et son environnement (on le mesure souvent après 1 jour d'immersion de l'électrode dans la solution). Cette technique simple apporte des informations préliminaires sur la nature des processus qui se développent à l'interface métal/électrolyte : corrosion, passivation. L'allure générale de la courbe indique si le matériau se passive : c'est le cas si l'on constate une augmentation du potentiel en fonction du temps.

**Appareillage** - Le potentiel d'électrode en circuit ouvert a été enregistré avec un appareil MATRIX 20. L'électrode de référence était constituée de Ag/AgCl.

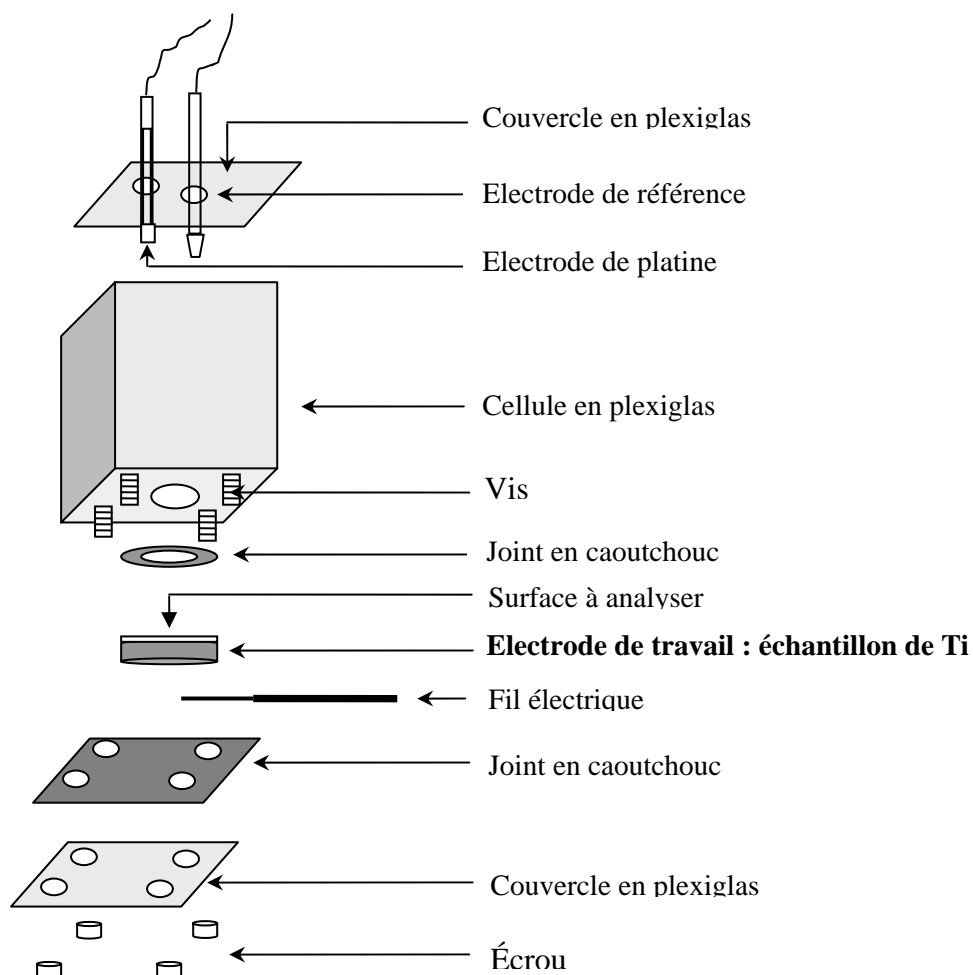
### 2.2.8.2. Voltamétrie cyclique

**Principe** - La voltamétrie est une technique d'électro analyse basée sur la mesure du flux de courant résultant des phénomènes électrochimiques qui se produisent à la surface de l'électrode sous l'effet d'une variation contrôlée de la différence de potentiel entre deux électrodes spécifiques. La *voltamétrie cyclique* repose sur un balayage linéaire aller-retour du potentiel, permettant la mesure des courbes  $i = f(E)$  pour l'oxydation et la réduction du composé. Cette technique permet de calculer le *potentiel de corrosion* ( $E_{\text{cor}}$ ), le *courant de corrosion* ( $I_{\text{cor}}$ ) et la *résistance à la polarisation* ( $R_p$ ). Ces trois grandeurs sont déterminées en utilisant la méthode de polarisation linéaire à partir des courbes de voltamétrie cyclique (courbes densité de courant – potentiel) à l'aide d'un montage potentiodynamique à trois électrodes.  $E_{\text{cor}}$  correspond au potentiel à partir duquel le film de passivation s'altère et de ce fait la corrosion du biomatériau permet de déterminer l'intensité de courant critique ( $I_c$ ) ou la densité de courant critique ( $i_c$ ) qui sont les valeurs à atteindre pour passiver le matériau.



**Figure 2.6.** Schéma du circuit électronique du potentiostat utilisé en voltamétrie cyclique

**Appareillage** - Les courbes densité de courant en fonction du potentiel ont été enregistrées avec un voltamètre Voltalab 40. Le montage du potentiostat est représenté sur la Figure 2.6. Les courbes densité de courant en fonction du potentiel étaient enregistrées après 10 minutes d'immersion de l'électrode à étudier dans la solution. La vitesse de balayage du potentiel était de 2mV/s. Une fois arrivé à 3500 mV, la direction de balayage a été inversée vers la valeur de départ : - 800mV.



**Figure 2.7.** Vue éclatée de la cellule électrochimique utilisée en voltamétrie cyclique

La figure 2.7 présente la cellule à trois électrodes utilisée pour les mesures de voltamétrie cyclique : Les trois électrodes sont les suivantes :

- une *électrode de travail* : le substrat Ti recouvert du dépôt de  $\text{TiO}_2$  ;
- une *électrode auxiliaire en platine* ;
- une *électrode de référence* Ag/AgCl avec comme électrolyte une solution saturée en KCl.

## 2.3. Caractérisation biologique des dépôts

Les cultures cellulaires de fibroblastes gingivales HGF-1 et ostéoblastes hFOB1.19 ont été réalisées à la Faculté de Biologie de l'Université de Bucarest, dans le Département de Biochimie et Biologie Moléculaire.

### 2.3.1. Milieux de cultures cellulaires et réactifs

Toutes les solutions sont préparées dans de l'eau déionisée, stérilisée par filtration (0,2 µm) et conservée entre 2 et 8°C. La grande majorité des réactifs et des milieux de culture proviennent de la société Sigma.

**Milieu de culture des fibroblastes** : DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) additionné de 4 mM de L-glutamine, 1,5 g/L de bicarbonate de sodium, 4,5g/L de glucose, 10% de sérum foetal bovin, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine.

**Milieu de culture des ostéoblastes** : un mélange 1:1 de DMEM et milieu Ham's F12 additionné de 2,5 mM de L-glutamine, 15 mM d'HEPES, 0,5 mM de pyruvate de sodium, 1,2 g/l de bicarbonate de sodium, 0,3 mg/ml de G418, 10% de sérum foetal bovin, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine.

#### **Réactifs**

- Solution tampon de phosphates salins (PBS), stérilisée par filtration (passage de la solution à travers un filtre stérile de dimension des pores 0,22 µm), 200 mg de KCl, 200 mg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,16 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O et 8 g de NaCl dissous dans 1L d'eau milliQ, pH: 7,2 – 7,4.
- Solution de trypsine / EDTA : trypsine 0,25% et EDTA 0,53 mM dans PBS.
- Solution de bleu Tripa : 0,4% préparé en PBS.

**Matériel jetable (utilisation unique) (NuncBrand products)** : flacons de culture, boîtes de Pétri, microplaques, pipettes stériles.

Les cultures cellulaires développées sur les films de TiO<sub>2</sub> et sur Ti ont été comparées avec les cultures réalisées en l'absence de ces films, cultures contrôle. Les supports de titane recouverts d'oxyde (disques de 10 mm de diamètre et 1 mm d'épaisseur) ont été stérilisés à 180°C pendant 30 minutes.

### 2.3.2. Caractéristiques des fibroblastes HGF-1

Les fibroblastes gingivaux utilisés appartiennent à la lignée HGF-1 (Human Gingival Fibroblasts) de provenance ATCC (American Type Culture Collection). Elles ont été isolées à partir du tissu gingival normal d'un homme de 28 ans, en bonne santé.

Les cellules ont été cultivées dans le milieu DMEM décrit en 2.3.1 et incubées à 37°C, dans une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub> et observées chaque jour au microscope en contraste de phase. La densité d'ensemencement des fibroblastes était de 10<sup>4</sup> cellules/cm<sup>2</sup>.

### 2.3.3. Caractéristiques des ostéoblastes h-FOB1.19

La lignée cellulaire h FOB1.19 (CRL-11372 ; ATCC) dérive d'un os de membre d'un fœtus humain. Elle a été immortalisée par transfection avec un vecteur d'expression permettant l'expression d'une forme de l'antigène T du virus simien 40 (SV 40), dépendante de la température (pUCSVtsA58), et un vecteur d'expression du gène de résistance à la néomycine (pSV2-neo). Le vecteur pUCSVtsA58 offre aux cellules une durée de vie prolongée et une vitesse de prolifération plus élevée à 35°C. Le milieu de croissance est décrit en 2.4.1. Les cellules ont été maintenues à 34°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>.

Pour avoir la même densité de cellules pour tous les échantillons au moment de l'ensemencement, les cellules (fibroblastes et ostéoblastes) ont été dénombrées, avant de les cultiver, à l'aide d'un dispositif Burkert-Turk. Les cellules non-viables ont été marquées avec du bleu Trypan 0,4%. La densité d'ensemencement des ostéoblastes était de  $1,5 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>.

### 2.3.4. Techniques de caractérisation des cellules

Dans la plupart des études décrites ci-dessous, le temps de culture était de 72 heures. Les tests de mise en évidence de la fibronectine ont nécessité un temps plus long pour la construction du réseau de fibrine.

#### 2.3.4.1. Observation des cytomorphologies.

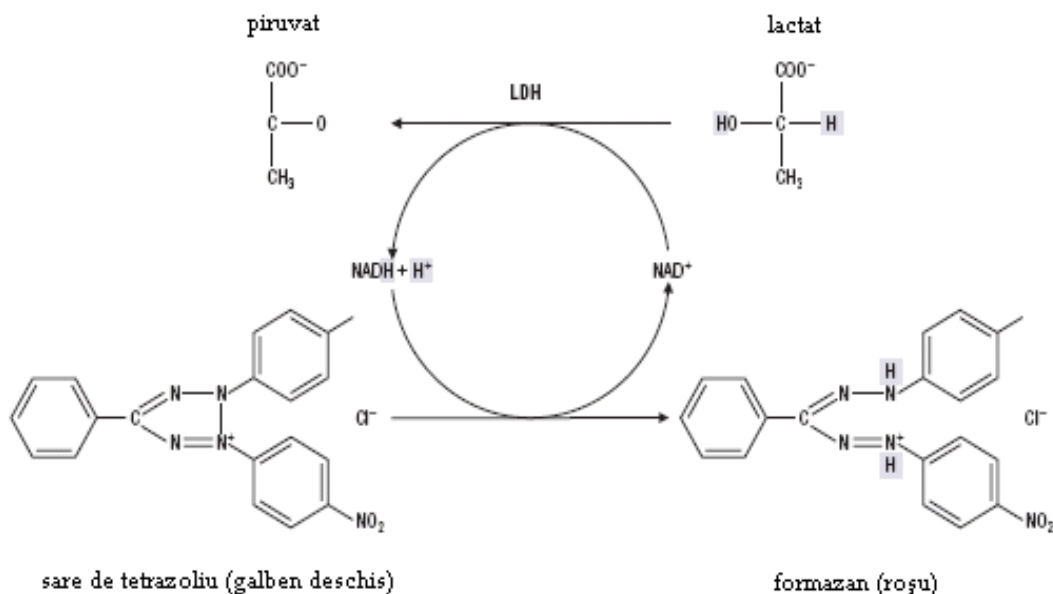
La morphologie des cellules attachées sur le support en plastique ou sur la surface d'intérêt (cytomorphologie) et l'évolution en cours de culture ont été observées à l'aide d'un microscope à contraste de phase Nikon TS 100, après des temps de culture de 24, 48 et 72 heures. Seules les cellules présentes sur le support transparent (le contrôle et l'interface plaque plastique / matériaux d'intérêt) peuvent être visualisées en contraste de phase. La morphologie des cellules sur échantillon opaque a été mise en évidence par détection d'actine en microscopie de fluorescence.

#### 2.3.4.2. Etude de l'intégrité des membranes cellulaires par le test LDH

L'éventuelle cytotoxicité des échantillons a été évaluée par l'estimation de l'activité de lactate déshydrogénase (LDH). C'est une détermination spectrophotométrique de l'activité exprimée par l'enzyme libérée dans le milieu de culture, après la lyse de la membrane cytoplasmique. Dans notre cas, cette méthode a été réalisée à l'aide du kit Sigma *In vitro toxicology assay kit lactate dehydrogenase based* qui permet de déterminer le degré de réduction d'un sel de tétrazolium en formazane (composé rouge). La méthode repose sur la réaction de réduction de NAD<sup>+</sup> en NADH,



utilisé dans la conversion stœchiométrique d'un sel de tétrazolium jaune (Schéma ci-dessous). Une diminution de la viabilité cellulaire est associée à la lyse de la membrane plasmique ; la libération du LDH dans le milieu de culture entraîne l'augmentation de la densité optique à 490nm.



#### 2.3.4.3. Etudes immuno-cytochimiques pour la détection de la fibronectine, des protéines de cytosquelette et de l'antigène Ki 67 par microscopie de fluorescence

Les techniques immunocytochimiques permettent de mettre en évidence les protéines dans les compartiments intra- et extracellulaires en utilisant des anticorps spécifiques couplés avec un marqueur fluorescent. Nous avons utilisé les anticorps suivants : IgG1 de souris (anti-fibronectine; anti-β1 intégrines; anti- α tubuline ou anti - Ki67) ; anticorps secondaire IgG de chèvre, anti-souris couplé avec FITC.

Après trois jours de culture (cinq jours dans l'étude de détection de fibronectine) les cellules ancrées sur les supports ont été rincées avec du PBS, fixées dans une solution de paraformaldéhyde à 4%, rincées de nouveau avec du PBS et perméabilisées avec une solution BSA 2% / Triton X-100 0,1%. Les échantillons ont été incubés deux heures avec des anticorps de souris dirigés contre les protéines d'intérêt, rincés avec du PBS et incubés avec l'anticorps de chèvre anti-souris couplé avec FITC (1 heure).

Pour la visualisation des noyaux, les échantillons ont été traités dans une étape suivante avec 2μg/ml de DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindole) – un composé qui fluoresce dans le bleu après interaction dans l'ADN double-brin.

Les images des cellules présentes sur la surface d'intérêt ont été obtenues avec le microscope en fluorescence Olympus IX71 et enregistrées avec le système d'acquisition Cell F image.

#### **2.3.4.4. Détection de l'actine marquée à la phalloïdine**

Le marquage à la phalloïdine donne des indices sur la morphologie et l'orientation des cellules sur la surface du support. Les filaments d'actine de cytosquelette ont été mis en évidence après le marquage de cellules avec de la phalloïdine qui a une grande affinité pour l'actine filamentueuse (F). Après trois jours de culture, les cellules ancrées sur les supports ont été rincées avec PBS, fixées dans une solution de paraformaldéhyde 4%, rincées de nouveau avec du PBS et perméabilisées avec BSA 2% / Triton X-100 0,1%. Cette étape est suivie par l'addition de phalloïdine conjugué au FITC (20µg/ml in PBS). Les échantillons ont été visualisés au microscope en fluorescence et les images enregistrées avec le logiciel mentionné plus haute.

#### **2.3.4.5. Analyse de la prolifération cellulaire par la détection de 5'-bromodéoxyuridine incorporé par les cellules**

Le bromodéoxyuridine (BrdU) peut se substituer à la timidine lors de la synthèse de l'ADN des cellules en cours de prolifération. Les cellules qui ont assimilé du BrdU dans l'ADN peuvent être détectées rapidement en utilisant des anticorps monoclonaux contre le BrdU et un anticorps secondaire conjugué avec une enzyme ou un fluorochrome.

Pour la détection d'incorporation du BrdU, les cellules en phase de croissance exponentielle ont été traitées avec du BrdU (10mM) pendant 16 heures. Après retrait du milieu de culture, les cellules présentes sur les supports analysés ont été fixées et perméabilisées en utilisant le protocole décrit au paragraphe précédent. Pour faciliter la liaison des anticorps primaires anti-BrdU, l'ADN a été dénaturé par traitement avec une solution d'HCl 1N (10 minutes à la température ambiante) et d'HCl 2N (10 minutes dans l'eau glacée, puis 30 minutes à 37°C). La visualisation de ces cellules a été réalisée à l'aide du microscope en fluorescence, après l'incubation des échantillons avec un anticorps secondaire anti-souris couplé au FITC.

Dans cette étude et dans les études imunocytochimiques présentées précédemment, des échantillons *contrôle* ont été préparées par la substitution de PBS aux anticorps primaires.

#### **2.3.4.6. Détermination du niveau d'expression protéique d'antigène de prolifération nucléaire (PCNA) par la technique Western blot**

La méthode Western blot consiste à séparer les protéines dans un gel de polyacrylamide par électrophorèse et à les transférer sur une membrane de nitrocellulose pour les détecter avec des anticorps. Les électrophorèses sont réalisées en condition dénaturante en présence de dodécil sulfate de sodium, SDS (SDS–PAGE).

Pour cette étude, les cellules ont été décrochées de leur support avec une solution de trypsine / EDTA, puis lysées par ultrasons. Les lysats cellulaires ont été soumis à une électrophorèse dans des quantités de protéines identiques et séparées sur des gels de polyacrylamide 7,5%. Après le transfert de bandes protéiques sur la membrane de nitrocellulose, les sites de liaison non-spécifiques ont été bloqués

avec une solution du lait dégraissé 5% / Tween-20 0,1% dans un tampon TBS. La protéine PCNA a été ensuite détectée par incubation séquentielle avec du IgG1 de souris anti PCNA et un anticorps secondaire IgG de chèvre anti-souris couplé avec la phosphatase alcaline. La détection chromogénique d'une bande spécifique correspondant à PCNA (~36 kDa) a été possible par l'ajout du substrat enzymatique NBT/BCIP (blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)

#### **2.3.4.7. Analyse zymographique pour la mise en évidence de métalloprotéinases matricielles (MMP) avec activité gélatinolytique**

Les enzymes MMP sont impliquées dans la dégradation des molécules de la matrice extracellulaire. Pour détecter l'activité gélatinolytique spécifique aux métalloprotéinases matricielles (MMP) secrétées par les cellules dans le milieu de culture, nous avons utilisé une méthode d'électrophorèse (la gélatine zimographie) modifiée d'après la méthode de Manicourt et Lefebvre [4]. Elle présente une grande sensibilité, permettant d'identifier l'enzyme d'intérêt (les formes pro-enzymatiques et les formes actives) dans un mélange complexe de protéinases, et l'estimation de masses moléculaires. Après 24, 48 ou 72 heures de culture des cellules dans du milieu sans rouge de phénol, le milieu est prélevé, concentré dix fois et les protéines sont séparées par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide 7,5% contenant 0,1% de gélatine, en présence de 0,1 SDS et dans des conditions non-réductrices. A la fin de l'électrophorèse, le gel est rincé avec une solution de 2,5% Triton X-100 pour éliminer le SDS et pour permettre la renaturation des protéines. Puis, le gel est incubé pendant une nuit à 37°C dans du tampon 0,05M Tris (pH 7,6). Enfin, le gel est coloré avec du Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,1%) et décoloré dans un mélange méthanol / acide acétique / eau distillée : 3/1/6. L'activité du MMP apparaît sous forme de bandes incolores sur l'arrière.

## **Références**

1. F.D. Duminica, F. Maury, F. Senocq, *Atmospheric pressure MOCVD of TiO<sub>2</sub> thin films using various reactive gas mixtures*. Surface and Coatings Technology, 2004. **188-189**: p. 255-259
2. C.J. Van Oss, M.K. Chaudhury, R.C. Good and *Interfacial Lifshitz-van der Waals and polar interactions in macroscopic systems*. Chem. Rev., 1988. **88**: p. 927- 941.
3. D.K. Owens, R.C. Wendt, *Estimation of the surface free energy of polymers*. J. Appl. Polym. Sci. , 1969. **13**: p. 1741– 1747.
4. D.H. Manicourt, V. Lefebvre, *An assay for matrix metalloproteinases and other proteases acting on proteoglycans, casein, or gelatin*. Anal Biochem, 1993. **215**: p. 171-179.

## Chapitre III - Croissance et caractérisation des films de TiO<sub>2</sub>

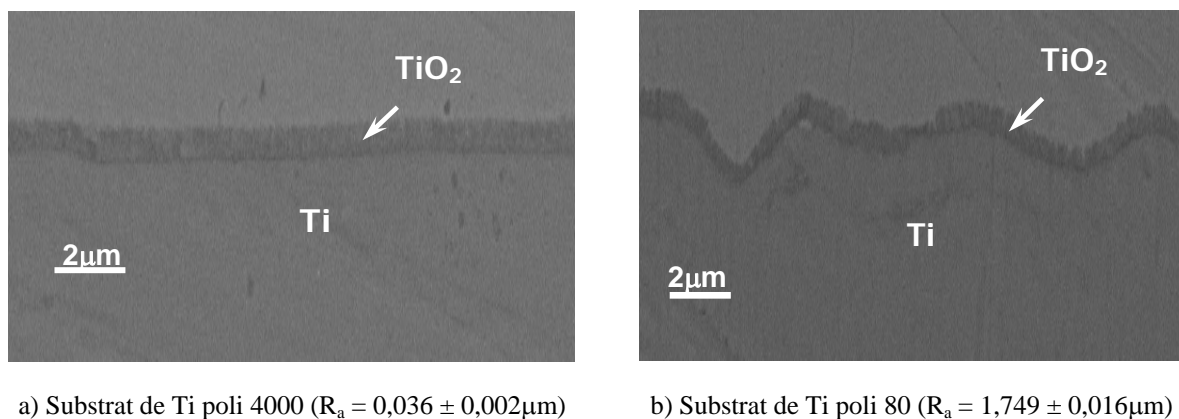
## Chapitre III - Croissance et caractérisation des films de $\text{TiO}_2$

Ce chapitre est consacré aux propriétés structurales, morphologiques et de surface des dépôts de  $\text{TiO}_2$  sur support plan de titane (et sur plaquette de silicium dans le cas des dépôts par MOCVD). Le chapitre est divisé en deux parties. Une première partie concerne les films obtenus par MOCVD : elle décrit l'influence des paramètres opératoires (température, pression, durée, fraction molaire du précurseur) sur les caractéristiques microstructurales des films (composition allotropique, morphologie, texture, rugosité, mouillabilité, adhérence). Ces caractéristiques sont susceptibles de jouer un rôle important sur le comportement électrochimique et sur le développement cellulaire. Nous avons également étudié la cinétique de croissance des films préparés par la méthode MOCVD. La deuxième partie est consacrée aux films de  $\text{TiO}_2$  obtenus par oxydation anodique.

### 3.1. Films de $\text{TiO}_2$ préparés par LP-MOCVD

#### 3.1.1. Conformité du dépôt de $\text{TiO}_2$

Un aspect important du processus de dépôt d'un film sur un substrat est la conformité du recouvrement de la surface par le film déposé. La conformité se réfère à la capacité d'obtenir par un processus de dépôt un film d'épaisseur constante qui suit de manière uniforme le contour de la surface. Un des avantages de la technique MOCVD à basse pression (LP-MOCVD) est qu'elle permet de réaliser des dépôts conformes. Pour vérifier que les reliefs introduits par un polissage grossier ne nuisent pas à la conformité des films, deux dépôts ont été élaborés sur deux substrats de titane soumis l'un à un poli 4000, très fin (Figure 3.1.a.), l'autre à un poli 180, plus grossier (Fig. 3.1.b).



**Figure 3.1.** Des dépôts de  $\text{TiO}_2$  sur deux substrats de titane de topographies différentes

Sur chacun des clichés, il est évident que le film d'oxyde épouse le profil de la surface avec une épaisseur constante. Cette caractéristique du dépôt CVD à basse température est très importante car la surface des dispositifs implantés a souvent une forme complexe.

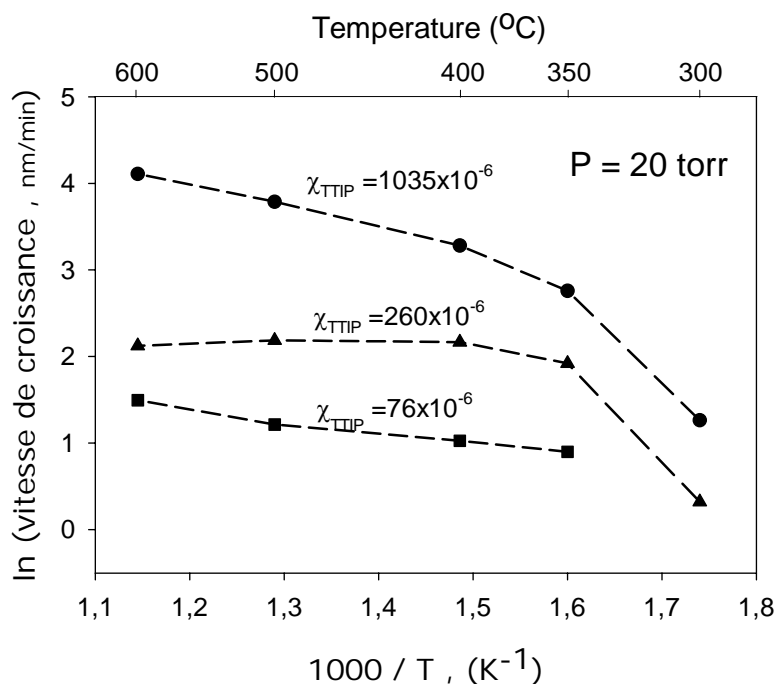
### 3.1.2. Cinétique de croissance des films de TiO<sub>2</sub>

La vitesse de croissance des films de TiO<sub>2</sub> a été estimée en divisant l'épaisseur du dépôt par la durée de sa croissance (temps de dépôt). L'épaisseur des dépôts sur titane a été déduite de la prise de masse des substrats ; elle a également été mesurée à partir du spectre de réflectance. Les limites de ces deux méthodes ont été discutées dans le Chapitre 2. L'épaisseur des dépôts sur silicium est, grâce au clivage facile du silicium, mesurable sur les micrographies prises au MEB de leurs sections transverses. L'épaisseur des films préparés se situe entre 0,2 et 2,5 µm.

#### 3.1.2.1. Cinétique de croissance sous 20 torr

La vitesse de croissance  $v$  d'un film de TiO<sub>2</sub> est influencée par deux facteurs majeurs : la température de dépôt et la fraction molaire de précurseur. L'influence de la température est exprimée par la loi d'Arrhenius :

$$v = A \exp\left(-\frac{Ea}{RT}\right).$$

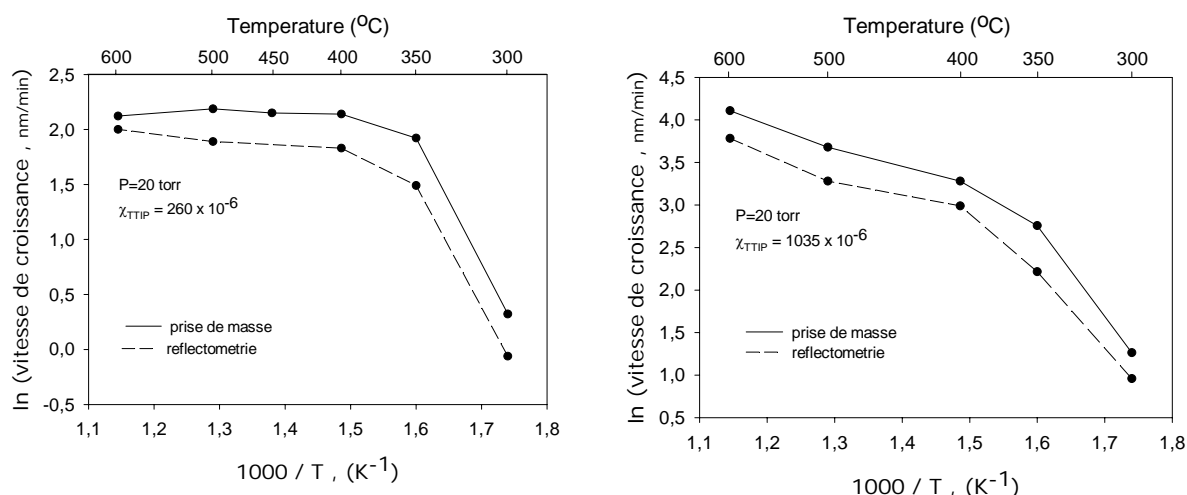


**Figure 3.2.** Diagrammes d'Arrhenius de la vitesse de croissance de films de TiO<sub>2</sub> sur titane sous P=20 torr, pour différentes fractions molaires (épaisseur déduite de la prise de masse).

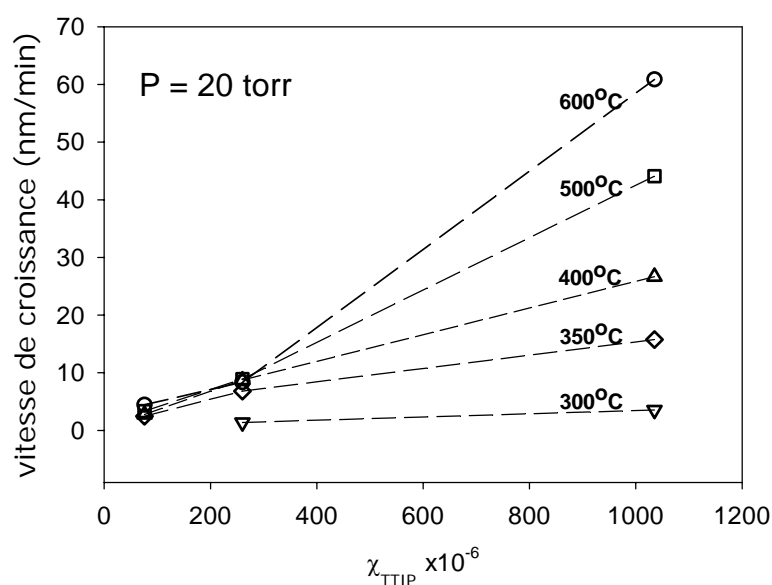
La Figure 3.2 présente les résultats de cette étude sous la forme de diagrammes d'Arrhenius : variation du logarithme de la vitesse en fonction de l'inverse de  $1/T(K)$ . Ces diagrammes, tracés pour

les trois fractions molaires utilisées pour les dépôts sous 20 torr ( $76$ ,  $260$  et  $1035 \times 10^{-6}$ ), montrent deux régimes cinétiques. Entre  $300^\circ\text{C}$  et  $350^\circ\text{C}$ , la vitesse de croissance augmente plus rapidement qu'à plus haute température. Dans ce premier domaine de température, la vitesse est contrôlée par la cinétique de la réaction. D'après la pente, l'énergie d'activation est de l'ordre de  $40 \text{ kJ/mole}$ . A partir de  $350^\circ\text{C}$ , c'est la diffusion à travers la couche limite qui contrôle la vitesse de croissance.

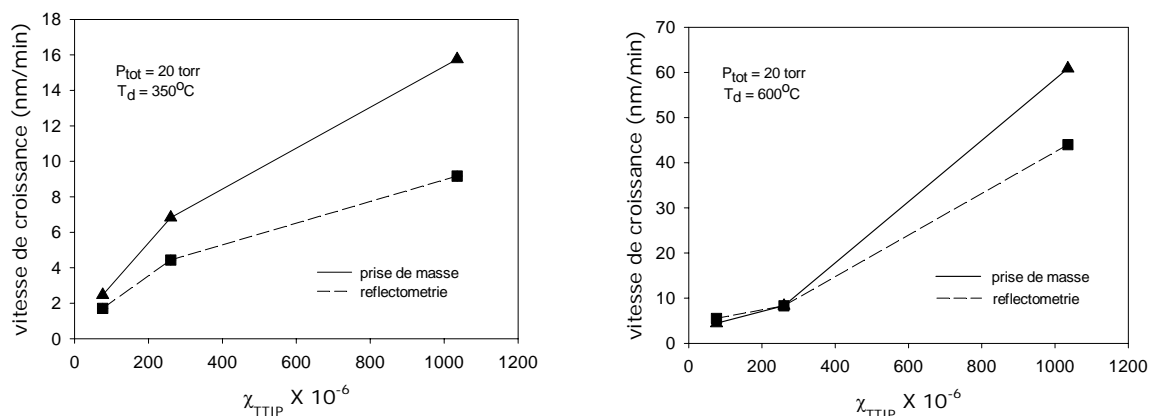
Les graphiques de la Figure 3.3 montrent, chacun pour une même fraction molaire donnée, l'écart entre les diagrammes construits en utilisant l'épaisseur déduite de la prise de masse et l'épaisseur mesurée par réflectométrie. Globalement, suivant les conditions de température et de fraction molaire, la vitesse de croissance des films préparés sous 20 torr varie de  $2$  à  $60 \text{ nm/minute}$ .



**Figure 3.3.** Comparaison des diagrammes d'Arrhenius pour deux fractions molaires (à gauche  $260 \times 10^{-6}$  ; à droite  $1035 \times 10^{-6}$ ), en calculant la vitesse de croissance à partir de l'épaisseur déduite de la prise de masse (trait continu) ou mesurée par réflectométrie (trait interrompu).



**Figure 3.4.** Variation de la vitesse de croissance des films de  $\text{TiO}_2$  préparés sous 20 torr, en fonction de la fraction molaire de TTIP, pour différentes températures de dépôt entre  $300$  et  $600^\circ\text{C}$  (l'épaisseur du film est déduite de la prise de masse).

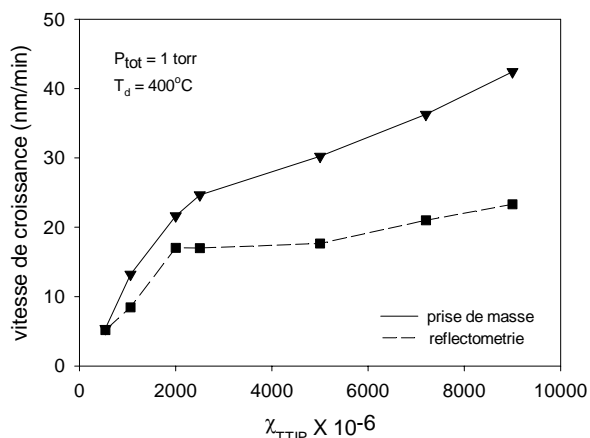


**Figure 3.5.** Variation de la vitesse de croissance des films de  $\text{TiO}_2$  préparés sous 20 torr à  $350^\circ\text{C}$  (à gauche) et à  $600^\circ\text{C}$  (à droite), en fonction de la fraction molaire, pour les deux méthodes de mesure de l'épaisseur.

Les Figures 3.4 et 3.5 montrent la variation de la vitesse de croissance de  $\text{TiO}_2$  en fonction de la fraction molaire sur le domaine de température  $300\text{--}600^\circ\text{C}$ . La Figure 3.5 illustre, pour deux températures de dépôt, l'influence de la méthode de mesure de l'épaisseur du film.

### 3.1.2.2. Cinétique de croissance sous 1 torr

Les dépôts sous 1 torr ont tous été réalisés à  $400^\circ\text{C}$ . Il n'est donc pas possible de présenter un diagramme d'Arrhenius. La vitesse de croissance en fonction de la fraction molaire est présentée sur la Figure 3.6. Les fractions molaires vont de  $500$  à  $9000 \times 10^{-6}$ .



**Figure 3.6.** Variation de la vitesse de croissance de film de  $\text{TiO}_2$  obtenu à 1 torr, en fonction de la fraction molaire de TTIP.  $T_{\text{dépôt}} = 400^\circ\text{C}$  (l'épaisseur du film est calculée par prise de masse et réflectométrie).

La pression étant plus basse que précédemment, à fraction molaire égale la vitesse de croissance diminue. On peut donc compenser en augmentant la fraction molaire. Ainsi, une vitesse de croissance de  $45 \text{ nm/min}$  est réalisable soit sous 20 torr, à  $500^\circ\text{C}$  avec  $\chi_{\text{TTIP}} = 1035 \times 10^{-6}$ , soit sous 1 torr, à  $400^\circ\text{C}$  avec  $\chi_{\text{TTIP}} = 9000 \times 10^{-6}$ . Mais les deux surfaces obtenues ont des morphologies très différentes. Pour cette raison, il est important de bien connaître l'influence des paramètres de dépôt



quand on cherche à obtenir un film ayant non seulement une épaisseur donnée mais également une morphologie donnée.

### 3.1.3. Etude de la morphologie des films par microscopie électronique à balayage (MEB)

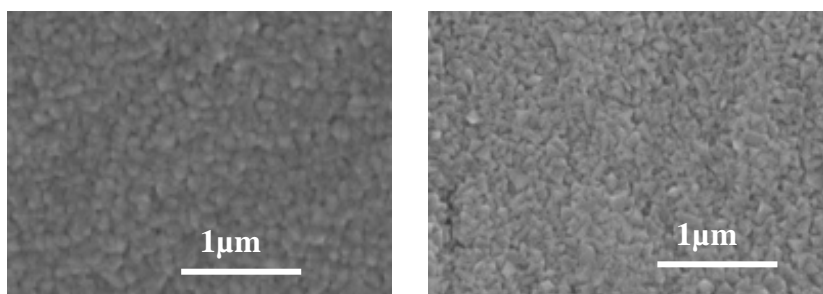
La température de dépôt, la fraction molaire du précurseur, la durée d'élaboration et la pression totale ont une influence déterminante sur la morphologie et la composition allotropique des films. La rugosité du substrat est également un facteur important. Dans un premier temps, nous présentons les résultats de l'influence de la température de dépôt, de la fraction molaire, de la durée d'élaboration et de la pression totale sur la morphologie et la composition allotropique. Ces résultats ont été obtenus sur des films déposés sur des substrats polis 4000, excepté les échantillons de la Figure 3.9 où les substrats sont polis 180. L'étude de l'influence de la rugosité sera présentée ensuite.

Pour étudier l'influence de la morphologie des films de  $\text{TiO}_2$  sur le comportement des cellules, il est nécessaire de préparer des films de morphologies variées et de bien les caractériser. Pour cela, nous avons fait varier les conditions opératoires de manière à obtenir des films de structure compacte et des films de structure colonnaire. Chacune de ces structures a ses avantages pour la qualité de l'interface entre le film de  $\text{TiO}_2$  et, d'une part, l'implant et, d'autre part, le tissu biologique.

Les analyses MEB de la surface des dépôts ont été effectuées directement sur les films déposés sur des substrats de titane. Par contre, les sections transversales ont été observées sur des dépôts sur silicium, à cause de la facilité de clivage de ce support. Les observations de la surface sous incidence normale ou oblique, fournissent des informations sur la nanostructure de la surface, en particulier sur les extrémités des colonnes en cas de croissance colonnaire. L'observation des sections transversales permet d'avoir des informations sur le mode de croissance des films et de mesurer leur épaisseur.

#### 3.1.3.1. Morphologie des dépôts élaborés sous 20 torr

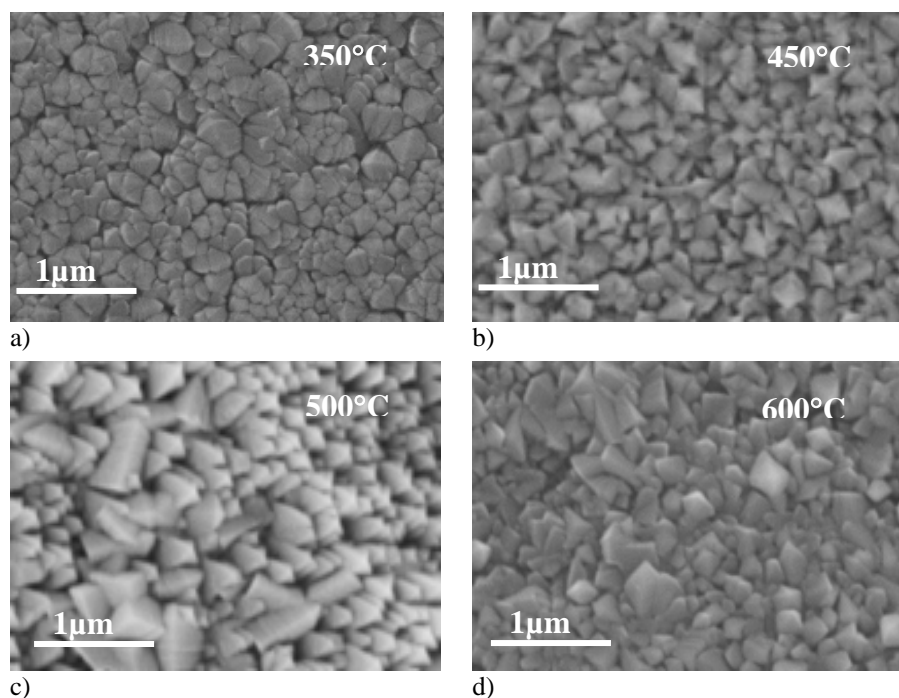
Les films de  $\text{TiO}_2$  ont été élaborés par le procédé MOCVD entre 300 et 600°C. L'influence de la température sur la morphologie a été étudiée sur des échantillons de même épaisseur.



**Figure 3.7.** Clichés MEB de la surface de dépôts d'épaisseur 400 nm, obtenus à 20 torr, avec  $\chi_{\text{TTIP}} = 76 \times 10^{-6}$ , à 350°C (à gauche) et 500°C (à droite).

Les films préparés à basse température (typiquement 350°C), avec une fraction molaire  $\chi_{\text{TTIP}} = 76 \times 10^{-6}$ , et dont l'épaisseur ne dépasse pas 1µm, présentent une morphologie très compacte (Figure 3.7), formée d'une agglomération des petits grains.

L'influence de la température sur la morphologie apparaît lorsque l'on opère avec une fraction molaire plus élevée ( $\chi_{\text{TTIP}} = 260 \times 10^{-6}$ ). La Figure 3.8 présente quatre échantillons d'épaisseur comparable (1000-1500 nm) préparés à des températures différentes. L'augmentation de la température favorise le mode de croissance colonnaire. Les colonnes ont une extrémité pointue et sont constituées de nanocristallites facettés (Figure 3.8.c,d).

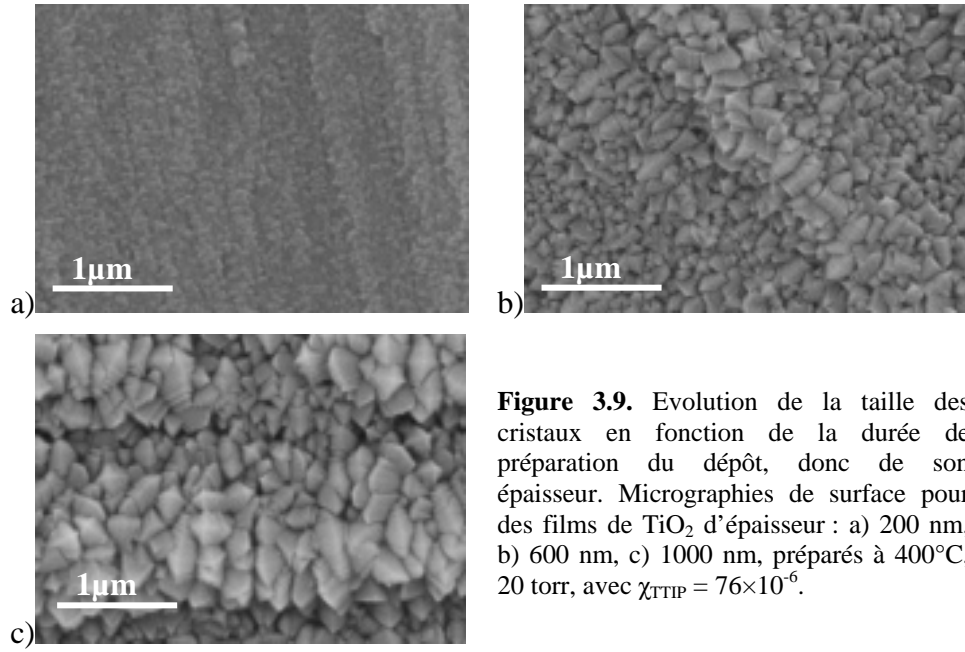


**Figure 3.8.** Clichés MEB de la surface de dépôts obtenus à  $P = 20$  torr, avec  $\chi_{\text{TTIP}} = 260 \times 10^{-6}$ , à :  
a) 350°C,  
b) 450°C,  
c) 500°C,  
d) 600°C.

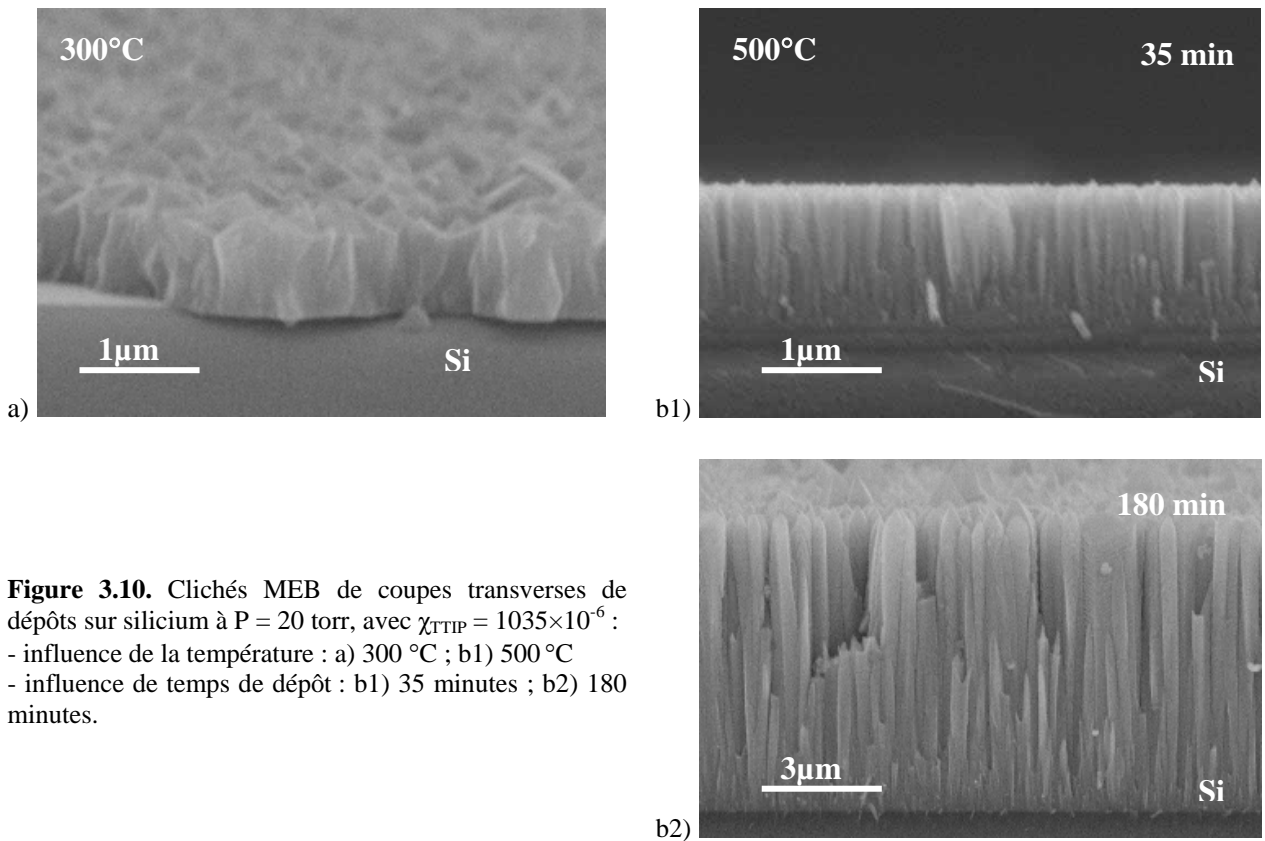
L'apparition du rutile à partir de 400°C, mise en évidence par diffraction des rayons X (voir plus bas), a été associée par Sarantopoulos[1] à l'apparition, sur les clichés MEB, de colonnes plus larges et plus claires que celles d'anatase. Sur les clichés de la Figure 3.8, la présence de grains plus clairs augmente avec la température de dépôt.

La Figure 3.9 illustre l'augmentation de la dimension des grains à la surface avec le temps de préparation du dépôt, donc son épaisseur pour des conditions données de croissance.

La Figure 3.10 montre la morphologie en section transverse pour les deux type de croissance : morphologie compacte d'un dépôt préparé à basse température avec une fraction molaire forte (Figure 3.10.a) ; morphologie colonnaire de deux dépôts préparés avec la même fraction molaire que précédemment mais à plus haute température (Figures 3.10.b1 et b2). Les deux structures colonnaires diffèrent par le temps de dépôt, donc par la largeur des colonnes et leur espacement. Il est important de remarquer que l'architecture en colonnes donne au film déposé un caractère poreux.

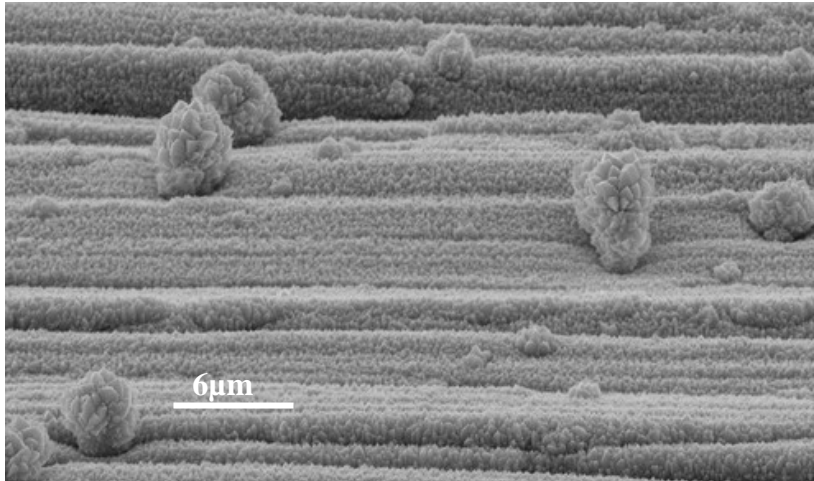


**Figure 3.9.** Evolution de la taille des cristaux en fonction de la durée de préparation du dépôt, donc de son épaisseur. Micrographies de surface pour des films de  $\text{TiO}_2$  d'épaisseur : a) 200 nm, b) 600 nm, c) 1000 nm, préparés à  $400^\circ\text{C}$ , 20 torr, avec  $\chi_{\text{TIP}} = 76 \times 10^{-6}$ .

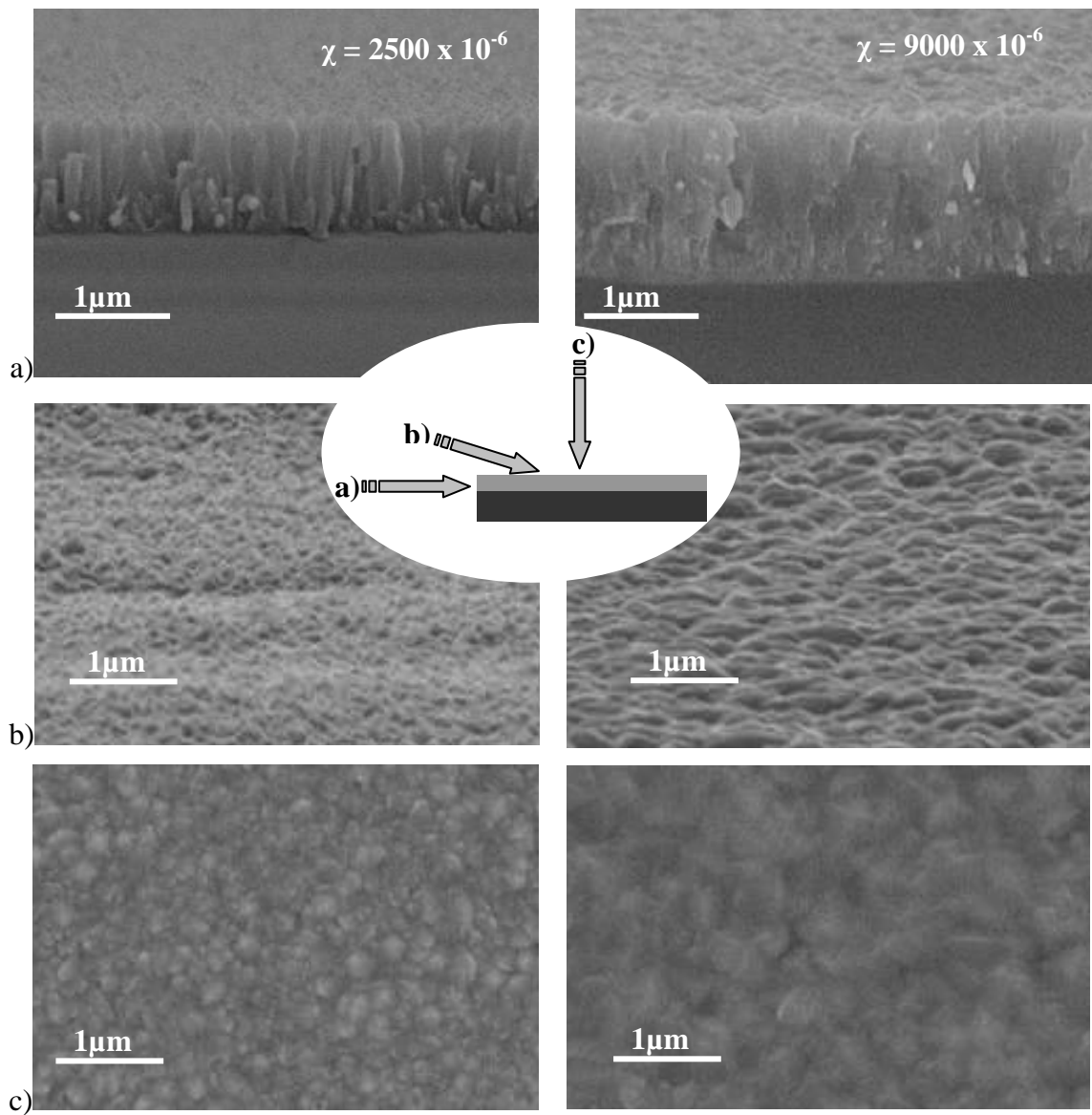


**Figure 3.10.** Clichés MEB de coupes transverses de dépôts sur silicium à  $P = 20$  torr, avec  $\chi_{\text{TIP}} = 1035 \times 10^{-6}$  :  
- influence de la température : a)  $300^\circ\text{C}$  ; b1)  $500^\circ\text{C}$   
- influence de temps de dépôt : b1) 35 minutes ; b2) 180 minutes.

La surface des films d'épaisseur supérieure à  $\sim 1,5 \mu\text{m}$  obtenus avec une fraction molaire faible est toujours couverte de gros amas cristallins (Figure 3.11.).



**Figure 3.11.** Morphologie de surface (cliché MEB) d'un film de  $\text{TiO}_2$  (1600nm) élaboré à 400°C, 20 torr, avec  $\chi_{\text{TTP}} = 76 \times 10^{-6}$



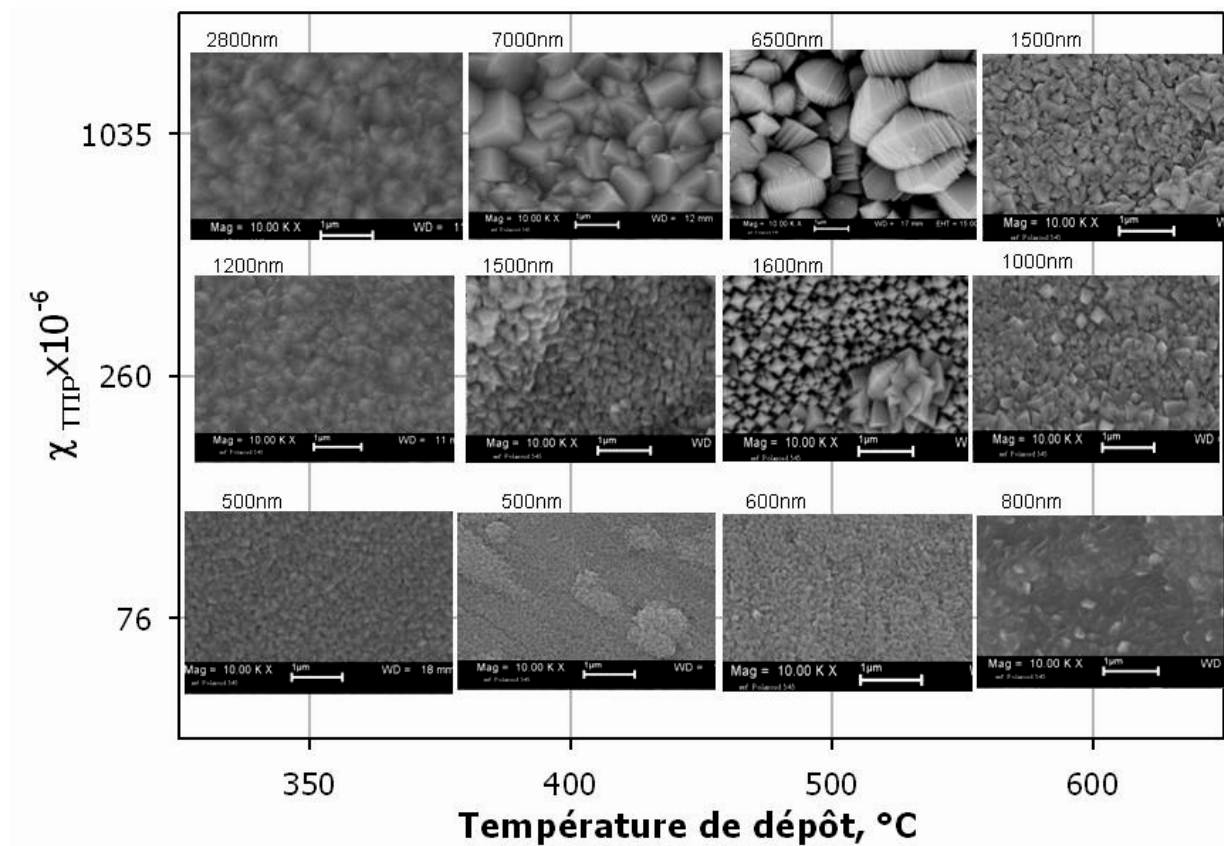
**Figure 3.12.** Différentes morphologies de films de  $\text{TiO}_2$  obtenus à 400°C, 1 torr, avec les fractions molaires  $\chi = 2500 \times 10^{-6}$  (colonne de gauche) et  $\chi = 9000 \times 10^{-6}$  (colonne de droite) : a) micrographie en coupe transverse ; b) morphologie sous un incidence de 7° ; c) morphologie sous incidence normale.

### 3.1.3.2. Morphologie des dépôts élaborés sous 1 torr

Rappelons que les dépôts sous 1 torr ont été préparés à  $400^\circ\text{C}$ , avec une fraction molaire située entre  $540$  et  $9000 \times 10^{-6}$ . Les clichés MEB de la Figure 3.12 comparent deux structures obtenues pour des fractions molaires très différentes :  $2500 \times 10^{-6}$  et  $9000 \times 10^{-6}$ . Abaisser la pression totale de 20 à 1 torr favorise la compacité des films à partir d'une fraction molaire de  $3000 \times 10^{-6}$ . La Figure 3.12 montre que la morphologie colonnaire obtenue pour  $\chi_{\text{TIP}} = 2500 \times 10^{-6}$  (colonne de gauche) est remplacée par une morphologie compacte lorsque la fraction molaire passe à  $\chi_{\text{TIP}} = 9000 \times 10^{-6}$  (colonne de droite).

La morphologie transverse ne suit pas la même évolution pour les deux pressions utilisées. Pour les films élaborés à 20 torr, les faibles fractions molaires donnent des films compacts, tandis que les fractions molaires fortes, nettement supérieures à  $1000 \times 10^{-6}$ , favorisent la croissance colonnaire. Par contre, sous 1 torr, la croissance colonnaire est obtenue pour des fractions molaires inférieures à  $3000 \times 10^{-6}$  ; pour les fractions molaires supérieures à  $3000 \times 10^{-6}$ , les films sont de plus en plus compacts.

La Figure 3.13 présente les morphologies de dépôts élaborés en faisant varier la température et la fraction molaire. La durée d'élaboration des films est de 3 heures (avec quelques exceptions). Ce diagramme met en évidence l'influence décisive de la température et de la quantité de précurseur.



**Figure 3.13.** Evolution de la morphologie des couches minces en fonction de la température et de la fraction molaire  $\chi_{\text{TIP}}$ . La durée d'élaboration des films a été de 3 heures, sauf pour les films élaborés à  $600^\circ\text{C}$ . Pour chaque cliché, l'échelle donnée correspond à  $1 \mu\text{m}$ .

Des observations au MEB on peut conclure que les dépôts sont homogènes et conformes aussi bien sur les surfaces lisses, que sur les surfaces rugueuses. Ils ne présentent ni écailles ni fissures qui pourraient endommager les propriétés mécaniques et protectrices. Pour les applications envisagées, nous nous sommes focalisés sur la préparation de films d'épaisseur maximale 2500 nm.

#### **3.1.4. Etude de la composition allotropique et de la texture par diffraction des rayons X**

La composition allotropique des films et leur texture sont potentiellement susceptibles de jouer un rôle dans leur capacité de protéger le titane contre la corrosion et leur aptitude à servir d'hôte aux cellules. Il est donc important d'étudier l'influence des conditions de préparation des films sur ces deux paramètres. Nous avons pour cela utilisé la diffraction des rayons X. En effet, les dépôts d'oxyde de titane préparés par MOCVD au cours de ce travail diffractent les rayons X et sont constitués de l'une des deux phases anatase ou rutile ou, le plus souvent, d'un mélange des deux.

Avant d'exposer les conclusions de cette étude, il convient de souligner certaines difficultés auxquelles elle s'est heurtée. Une première difficulté vient de l'impossibilité d'obtenir un diffractogramme du seul dépôt. Sur la plupart des diffractogrammes enregistrés en mode  $\theta$ - $\theta$ , les raies les plus intenses sont celles du titane. L'intensité des raies de diffraction de la couche d'oxyde dépend de son épaisseur. Les diffractogrammes des couches d'épaisseur inférieure à 0,5  $\mu\text{m}$  environ donnent une information limitée. A cette première difficulté s'ajoute le fait que certaines raies du rutile et de l'anatase sont très voisines de raies du titane. Leur présence se manifeste par un épaulement peu facile à analyser. Enfin, troisième difficulté, la très grande majorité des dépôts sont texturés. La conséquence immédiate de ce phénomène est qu'il n'est pas possible de faire une analyse quantitative du mélange anatase/rutile à partir des diffractogrammes.

##### **3.1.4.1. La texture des dépôts**

Sur pratiquement aucun des diffractogrammes, la raie (101) de l'anatase et la raie (110) du rutile n'ont l'intensité relative 100% qu'elles devraient avoir en l'absence d'orientations préférentielles. Le rutile présente très souvent l'orientation (200), seule ou accompagnée de l'une ou de plusieurs des orientations (110), (210), (211), (301). De même, l'anatase présente généralement les orientations (220), (211), (200).

L'orientation (200) du rutile est particulièrement prononcée dans les dépôts épais d'au moins 1,5  $\mu\text{m}$ , préparés sous 1 torr, sur des substrats polis 4000, avec une fraction molaire supérieure à  $3000 \times 10^{-6}$  ( $2000 \times 10^{-6}$  dans un cas). Cette orientation peut être si prononcée que la réflexion (200) du rutile apparaît comme la plus intense du diffractogramme, y compris par rapport aux raies du titane. Par contre, parmi les films préparés sous 20 torr, un seul contient du rutile très fortement orienté (200) : son épaisseur est de 1,5  $\mu\text{m}$  ; il a été élaboré à 400°C, comme les films préparés sous 1 torr, mais avec une fraction molaire faible, égale à  $260 \times 10^{-6}$ . La plupart des autres films préparés sous 20 torr ont une épaisseur inférieure à 1,5  $\mu\text{m}$  et le rutile n'y apparaît que modérément orienté (200).

Deux films préparés sous 20 torr sont épais de  $7\ \mu\text{m}$  : ils se distinguent par une orientation (220) très prononcée de l'anatase, la réflexion (220) correspondante apparaissant comme la plus intense sur le diffractogramme. Cet effet est lié à l'épaisseur, exceptionnelle dans cette étude, des dépôts. D'une manière générale, le développement d'orientations préférentielles est favorisé par l'augmentation de l'épaisseur, ce qui est normal, mais aussi par la finesse du polissage.

Il aurait été intéressant de calculer pour chaque dépôt ses coefficients de texture. Ce calcul suppose que les intensités de toutes les réflexions soient mesurées avec précision. A cause du chevauchement partiel de certaines réflexions des oxydes avec celle du titane – par exemple, la réflexion (200) du rutile à  $38,2^\circ$  est encadrée par les réflexions intenses (002) à  $38,4^\circ$  et (101) à  $40,2^\circ$  du titane ; de même, la réflexion (220) de l'anatase à  $70,4^\circ$  chevauche partiellement la réflexion (103) à  $70,7^\circ$  du titane – il faudra recourir à un programme de décomposition.

### 3.1.4.2. Influence de la température et de la pression sur la composition allotropique

L'influence de la température sur la composition allotropique des dépôts apparaît lorsque l'on examine les diffractogrammes de la série de dépôts préparés sous 20 torr à différentes températures entre  $300^\circ\text{C}$  et  $600^\circ\text{C}$  (rappelons que les dépôts préparés sous 1 torr l'ont tous été à  $400^\circ\text{C}$ ).

Les films obtenus à  $300^\circ\text{C}$  contiennent exclusivement de l'anatase. Du rutile commence à apparaître dans les films préparés à  $350^\circ\text{C}$ . La teneur en rutile augmente avec la température et les films préparés à  $600^\circ\text{C}$  sont très riches en rutile. L'augmentation de la température favorise la croissance du rutile au détriment de l'anatase. Cette tendance est bien connue. Mais, grâce au nombre élevé d'échantillons préparés une analyse plus fine montre que, pour une température donnée, la fraction molaire et le poli du substrat ont également une influence sur la composition allotropique.

**Tableau 3.1.** Illustration de l'influence de la pression sur la composition allotropique. Dans ce Tableau et les deux suivants, les lettres A (a) et R (r) rendent compte qualitativement des teneurs respectives en anatase et en rutile : les lettres minuscules correspondent au cas où la variété correspondante est très nettement minoritaire, voire à l'état de traces.

<b>T = <math>400^\circ\text{C}</math></b> épaisseur = $1,5\ \mu\text{m}$ poli 4000	P = 1 torr	P = 20 torr
$\chi = 1000 \times 10^{-6}$	R	A
$\chi = 2000 \times 10^{-6}$	a - R	A - r

La pression totale sous laquelle sont préparés les dépôts a, elle aussi, un effet sur la composition allotropique. Pour une température donnée et à fraction molaire, poli du substrat et épaisseur de dépôt comparables, les films préparés à 20 torr sont plus riches en anatase que les dépôts préparés sous 1 torr. Cet effet est illustré dans la Tableau 3.1 pour quatre films préparés à  $400^\circ\text{C}$  sur des substrats polis 4000, sous 1 torr et 20 torr, avec des fractions molaires voisines de  $1000 \times 10^{-6}$  et

$2000 \times 10^{-6}$ . Les lettres A (a) et R (r) rendent compte très qualitativement des teneurs en anatase et en rutile : les lettres minuscules indiquent que la variété correspondante est nettement minoritaire.

### 3.1.4.3. Influence de la fraction molaire et du poli du substrat sur la composition et la texture

#### Dépôts sous 20 torr

Le Tableau 3.2 présente une sélection de films épais d'environ  $1 \mu\text{m}$ , déposés sous 20 torr à  $350^\circ\text{C}$  et  $400^\circ\text{C}$ , avec différentes fractions molaires, sur des substrats polis 4000 ( $350^\circ\text{C}$  et  $400^\circ\text{C}$ ) ou 180 et 80 ( $400^\circ\text{C}$ ).

Outre le fait que l'augmentation de température favorise la formation de rutile, l'examen du Tableau 3.2 fait apparaître les tendances suivantes :

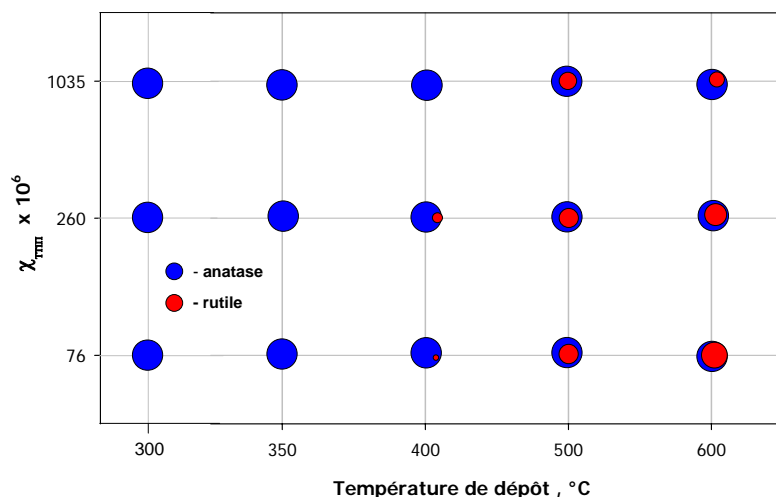
- l'augmentation de la fraction molaire favorise la formation d'anatase ;
- l'augmentation de la rugosité (diminution du poli) favorise la formation de rutile.

**Tableau 3.2.** Influence de la température, du poli du substrat et de la fraction molaire sur la composition des films préparés sous 20 torr.

<b>P = 20 torr</b>	$\chi = 76 \times 10^{-6}$	$\chi = 260 \times 10^{-6}$	$\chi = 1035 \times 10^{-6}$	$\chi = 1900 \times 10^{-6}$
$400^\circ\text{C}$ poli 4000	-	A – R ( $1,5 \mu\text{m}$ )	A ( $1,2 \mu\text{m}$ )	A ( $1,0 \mu\text{m}$ )
$400^\circ\text{C}$ poli 1000	-	-	A – r ( $1,0 \mu\text{m}$ )	-
$400^\circ\text{C}$ poli 180	A – R ( $1,0 \mu\text{m}$ )	-	A – r ( $1,2 \mu\text{m}$ )	-
$400^\circ\text{C}$ poli 80	-	A – R ( $1,0 \mu\text{m}$ )	A – r ( $1,2 \mu\text{m}$ )	-
$450^\circ\text{C}$ poli 4000	-	a – R ( $1,0 \mu\text{m}$ )		-
$450^\circ\text{C}$ poli 180	-	R ( $0,9 \mu\text{m}$ )		-

La Figure 3.14 propose un diagramme de phase dans l'espace température de dépôt – fraction molaire d'après les diffractogrammes d'échantillons préparés sous 20 torr.





**Figure 3.14** Domaines de formation de l'anatase et du rutile par MOCVD sur titane en fonction de la température et de la fraction molaire à P = 20 torr.

### Dépôts sous 1 torr

Les résultats reportés dans le Tableau 3.3 pour la série de films épais de 1,5  $\mu\text{m}$ , préparés sous 1 torr à 400°C sur des substrats polis 4000, montrent que, comme pour les films préparés sous 20 torr, l'augmentation de la fraction molaire favorise la formation d'anatase.

**Tableau 3.3.** Influence de la fraction molaire (et de l'épaisseur du dépôt) sur la composition des films préparés sous 1 torr à 400°C sur des substrats polis 4000.

P = 1 torr	540 10 <sup>-6</sup>	1068 10 <sup>-6</sup>	2000 10 <sup>-6</sup>	2600 10 <sup>-6</sup>	3200 10 <sup>-6</sup>	4500 10 <sup>-6</sup>	5000 10 <sup>-6</sup>	6000 10 <sup>-6</sup>	7200 10 <sup>-6</sup>	9200 10 <sup>-6</sup>
1,0 $\mu\text{m}$	a - R	-	-	-	-	-	-	-	A - r	-
1,5 $\mu\text{m}$	-	R	a - R	-	-	A - R	A - R	A - R	A - r	-
2,0 $\mu\text{m}$	-	-	-	-	-	-	-	-	a - R	A - r
2,5 $\mu\text{m}^\circ$	-	-	-	A - r	a - R	-	-	-	-	-

Les observations pour les autres épaisseurs sont très fragmentaires. On constate cependant que les deux échantillons les plus épais (2,5  $\mu\text{m}$ ) infirment la tendance dégagée par l'examen de tous les autres échantillons. S'agit-il d'un effet de l'épaisseur ? C'est un point qui mériterait une étude plus détaillée.

La série d'échantillons de même épaisseur (1,5  $\mu\text{m}$ ) préparés sous 1 torr à 400°C sur substrat poli 4000 permet de faire une observation intéressante sur l'influence de la fraction molaire sur la texture des films. Le Tableau 3.4 indique les intensités relatives des réflexions du rutile et de l'anatase dans cette série de films. La seconde ligne du Tableau rappelle les indices et les intensités relatives des réflexions tels qu'indiqués sur les fiches JCPDS 21-1276 pour le rutile et 21-1272 pour l'anatase. Les intensités relatives indiquées ensuite pour les films sont celles observées sur les diffractogrammes. Pour bien lire le Tableau 3.4, il faut se souvenir que les diffractogrammes comprennent non seulement les réflexions de l'oxyde déposé mais aussi celle du titane. Sur la majorité d'entre eux (mais pas sur tous comme le montre le Tableau 3.4), la réflexion la plus intense (100%) vient du titane. Par souci de clarté, les réflexions du titane ne sont pas reportées dans le Tableau 3.4.

**Tableau 3.4.** Evolution de l'intensité relative des réflexions observées pour le rutile et l'anatase avec la fraction molaire. Les échantillons, épais de 1,5 µm, ont été préparés à 400°C sous 1 torr, sur des substrats polis 4000.

<b>P = 1 torr</b> poli 4000 ép = 1,5 µm	rutile								anatase			
h k l	1 1 0	1 0 1	2 0 0	2 1 0	2 1 1	3 1 0	3 0 1	4 0 0	1 0 1	2 0 0	2 1 1	2 2 0
I <sub>rel</sub> (JCPDS)	100%	50	8	10	60	10	20	4	100	35	20	6
1068×10 <sup>-6</sup>	7	24	45	5	18	0	10	7	0	0	0	0
2000×10 <sup>-6</sup>	4	12	39	0	13	0	3	7	0	0	4	7
4500×10 <sup>-6</sup>	0	0	86	0	0	1	1	21	1	4	16	14
5000×10 <sup>-6</sup>	0	0	100	0	0	2	3	26	0	1	3	8
6000×10 <sup>-6</sup>	0	0	73	0	0	2	1	20	5	3	19	15
7200×10 <sup>-6</sup>	0	0	37	0	0	0	0	6	7	22	34	29

Il faut remarquer tout d'abord que, comme indiqué plus haut, la réflexion la plus intense n'est jamais celle indiquée sur la fiche JCPDS, aussi bien pour le rutile [réflexion (110)] que pour l'anatase [réflexion (101)] : dans le cas du rutile, la réflexion la plus intense observée est la (200) quelle que soit la fraction molaire ; c'est même la plus intense sur le diffractogramme obtenu avec  $\chi = 5000 \times 10^{-6}$ . Toujours pour le rutile, quand la fraction molaire augmente, les réflexions autres que la (200) diminuent d'intensité et disparaissent : sur la dernier diffractogramme, pour  $\chi = 5000 \times 10^{-6}$ , le rutile ne se manifeste que par sa réflexion (200) et la réflexion du second ordre correspondant (400).

Le film déposé avec  $\chi = 1068 \times 10^{-6}$  ne contient pas d'anatase. Au fur et à mesure que la fraction molaire augmente, des raies de l'anatase apparaissent et gagnent en intensité. Ceci confirme bien l'influence favorable de la fraction molaire sur la formation d'anatase déjà mentionnée plus haut. Les intensités relatives observées montrent que la texture est composée de trois orientations préférentielles : (211), (220) et (200). Cette dernière se manifeste de façon spectaculaire pour la fraction molaire la plus élevée.

Il reste à préciser l'influence de la rugosité du substrat, à travers son degré de polissage, sur le dépôt. A cette fin, une série de quatre substrats différant par leur poli ont été traités dans un même batch à 400°C sous 1 torr, avec la fraction molaire  $\chi = 2000 \times 10^{-6}$ . L'épaisseur du dépôt était égale à 1,5 µm. Les quatre diffractogrammes montrent la présence d'anatase. Mais les films déposés sur les substrats aux polis les plus grossiers (80 et 180) ne contiennent de rutile qu'à l'état de traces, comme le montre le report des intensités des réflexions du rutile présenté dans le Tableau 3.5. Ce n'est qu'avec les substrats polis 1000 et surtout 4000 que la teneur en rutile devient importante.

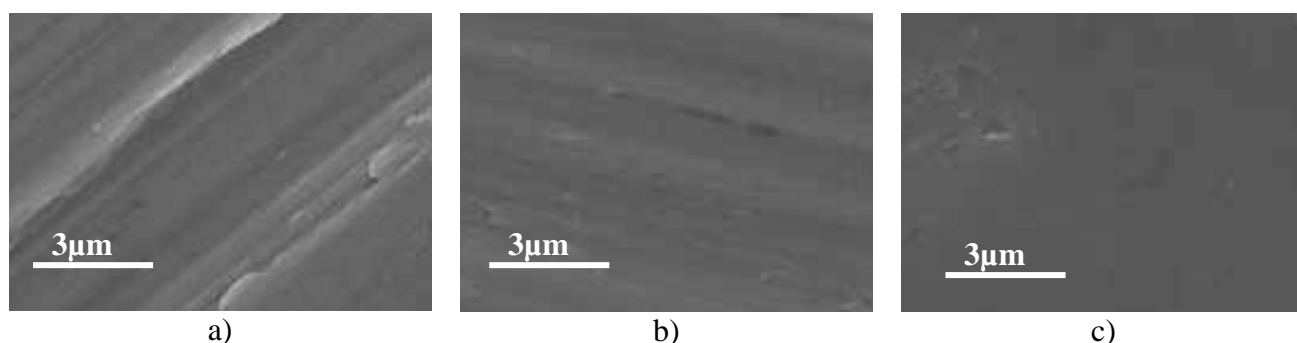
Ce résultat montre que, sous 1 torr, l'augmentation de la rugosité du substrat (diminution du poli) favorise la formation d'anatase. C'est l'inverse de la tendance observée pour les dépôts préparés sous 20 torr.

**Tableau 3.5.** Influence du poli du substrat sur la teneur en rutile des dépôts préparés sous 1 torr à 400°C. Le Tableau présente les intensités relatives observées pour les réflexions (110), (200), (310) et (400) du rutile en fonction du poli du substrat

P = 1 torr $\chi = 2000 \times 10^{-6}$ ép. = 1,5 $\mu\text{m}$	Indices des réflexions du rutile			
	1 1 0	2 0 0	3 1 0	4 0 0
Poli 80	1	0	0	0
Poli 180	1	0	0	0
Poli 1000	2	15	0	3
Poli 4000	0	86	2	21

### 3.1.5. Mesure de la rugosité des films

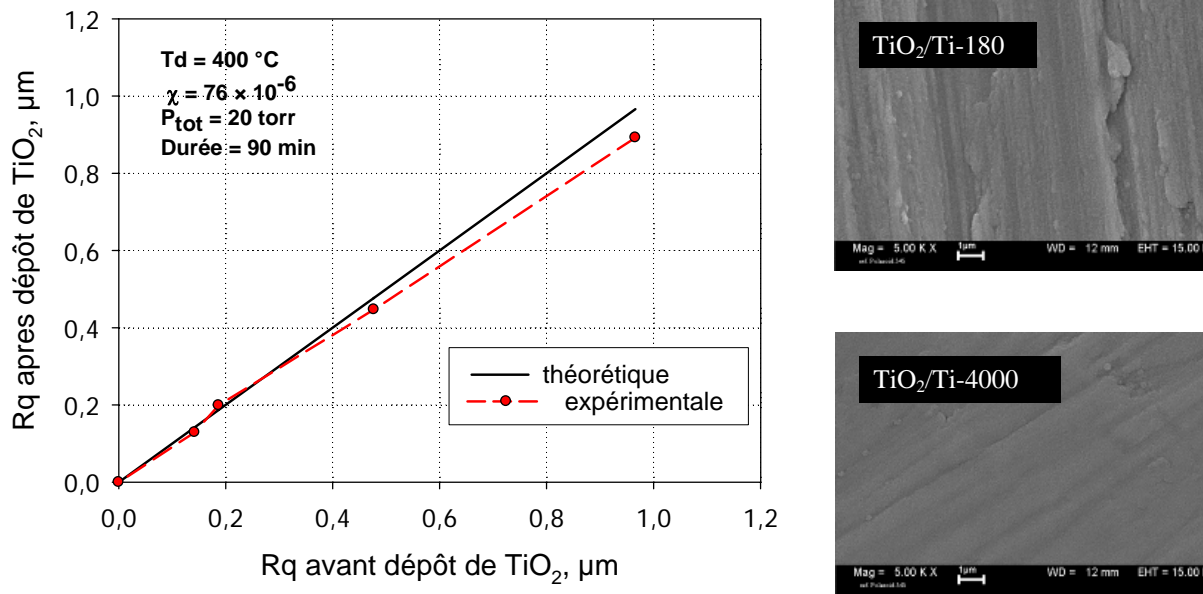
La rugosité des films de  $\text{TiO}_2$  est un facteur majeur, déterminant pour la qualité du développement cellulaire. Elle dépend de la rugosité initiale du substrat de titane et des conditions expérimentales choisies pour effectuer le dépôt. La rugosité initiale du substrat est fixée par son degré de polissage (Figure 3.15). La rugosité finale d'une couche d'oxyde dépend donc du degré de polissage du substrat et des conditions expérimentales de préparation du dépôt d'oxyde. Elle évolue essentiellement avec l'épaisseur du dépôt. L'examen de la littérature montre que les surfaces utilisées pour la croissance des cellules ont une rugosité située entre 0,02 et 6  $\mu\text{m}$  [2]. La rugosité des films élaborés dans ce travail se situe dans ce domaine.



**Figure 3.15.** Morphologie (clichés MEB) de trois échantillons de titane avant traitement par MOCVD, ayant subi un polissage au papier SiC : a) poli 180 ; b) poli 1000 ; c) poli 4000.

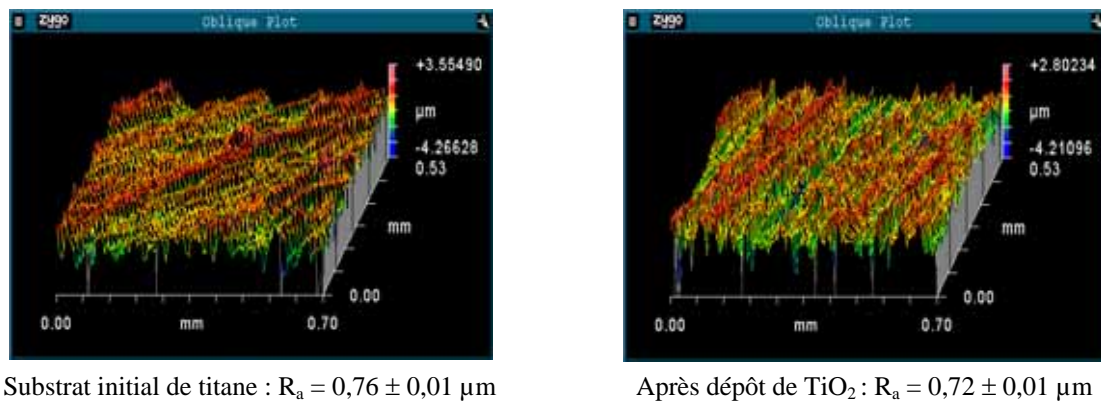
#### 3.1.5.1. Influence de la rugosité du substrat sur la rugosité du film

Des dépôts d'oxyde ont été élaborés sur des substrats de Ti polis avec des papiers de carbure de silicium (SiC) de différents grades (Figure 3.16) : 180 (polissage grossier), 1000, 2400, 4000 (polissage très fin). La rugosité a été mesurée avant et après le dépôt de  $\text{TiO}_2$ . La variation de la seconde en fonction de la première est présentée sur la Figure 3.16.

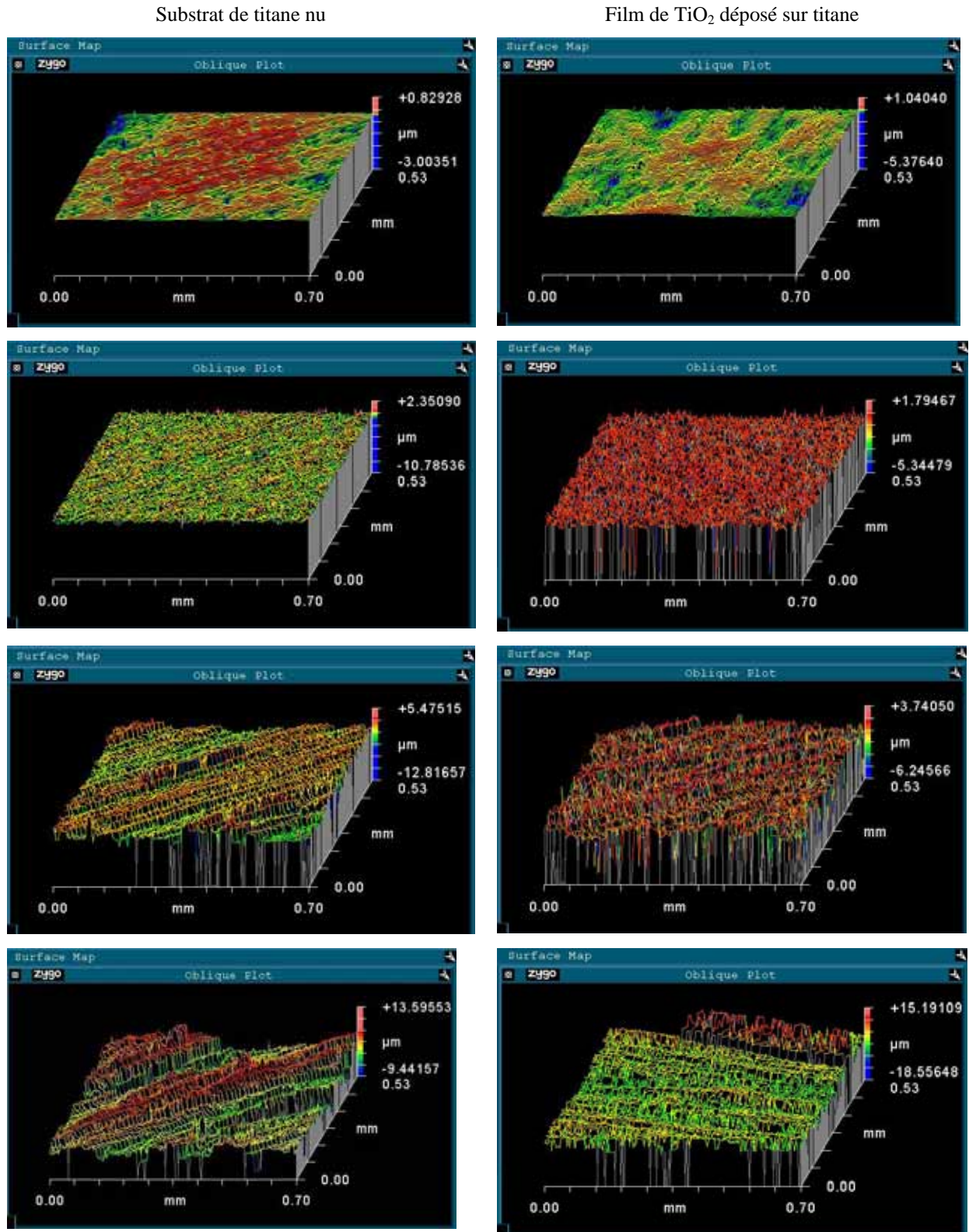


**Figure 3.16.** Variation de la rugosité finale après un dépôt de  $\text{TiO}_2$  de 200 nm, en fonction de la rugosité initiale du substrat. Les clichés MEB montrent des dépôts d'oxyde sur substrat de Ti poli 180 et poli 4000.

Pour des épaisseurs de dépôt autour de 200 nm, la rugosité finale est pratiquement égale à la rugosité initiale du substrat (Figure 3.17). Comme indiqué au début du Chapitre, le film d'oxyde épouse le contour de la surface, y compris les accidents créés par le polissage.



**Figure 3.17.** Images 3D d'une surface de titane non revêtu (à gauche) et d'un dépôt de  $\text{TiO}_2$  de 200 nm obtenu à  $T_d = 400^\circ\text{C}$ ,  $\chi = 76 \times 10^{-6}$  (à droite). Les analyses ont été faites sur  $(0,70 \times 0,53) \text{ mm}^2$ .



**Figure 3.18.** Images 3D pour différents pols du substrat de titane : 4000, 1000, 180, 80. La colonne de gauche montre le substrat non recouvert ; la colonne de droite montre le dépôt de  $\text{TiO}_2$  épais de 1600 nm obtenu à  $T_d = 400^\circ\text{C}$ ,  $P = 1$  torr, avec  $\chi = 4500 \times 10^{-6}$ . Mesures sur  $(0,7 \times 0,7) \text{ mm}^2$ .

Après avoir constaté qu'une épaisseur de 200 nm donne au dépôt pratiquement la même rugosité que le substrat, nous avons étudié également l'effet d'une épaisseur de dépôt plus importante.

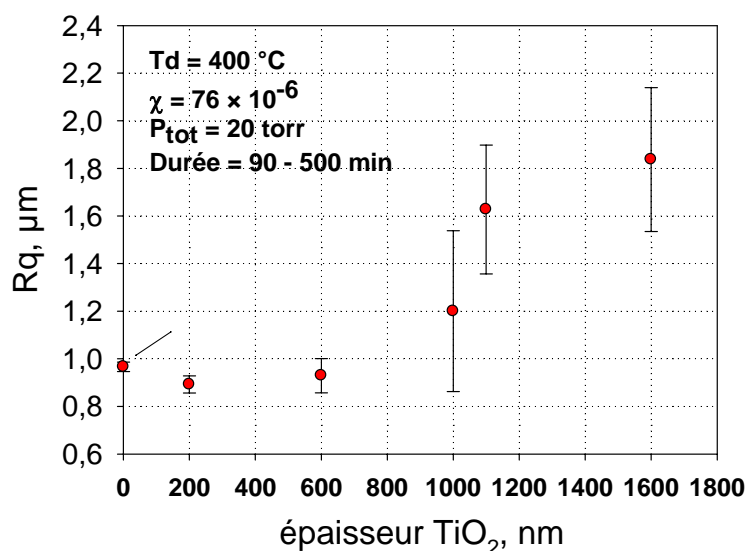
Quatre films épais de 1500nm, déposés sur titane à 400°C, sous 1 torr, avec  $\chi = 4500 \times 10^{-6}$ , ont été utilisés pour cette étude. Les valeurs mesurées des rugosités moyennes  $R_a$  et quadratique moyennes  $R_q$  sont données dans le Tableau 3.6. La Figure 3.18 montre la topographie 3D des films.

**Tableau 3.6.** Rugosité (mesurée sur  $0,70 \times 0,53 \text{ mm}^2$  de quelques films épais de 1500 nm déposés sur substrat de titane poli avec des papiers SiC de grade 80, 180, 1000 et 4000.

Polissage	Substrat Ti		TiO <sub>2</sub> / Ti	
	$R_a$ (μm)	$R_q$ (μm)	$R_a$ (μm)	$R_q$ (μm)
<b>4000</b>	$0,03 \pm 0,05$	$0,05 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,07$	$0,18 \pm 0,05$
<b>1000</b>	$0,35 \pm 0,18$	$0,45 \pm 0,12$	$0,45 \pm 0,05$	$0,80 \pm 0,12$
<b>180</b>	$1,13 \pm 0,04$	$1,41 \pm 0,08$	$1,62 \pm 0,10$	$1,87 \pm 0,03$
<b>80</b>	$2,15 \pm 0,17$	$2,94 \pm 0,10$	$2,54 \pm 0,29$	$3,40 \pm 0,33$

### 3.1.5.2. Influence de l'épaisseur de TiO<sub>2</sub> sur la rugosité du film

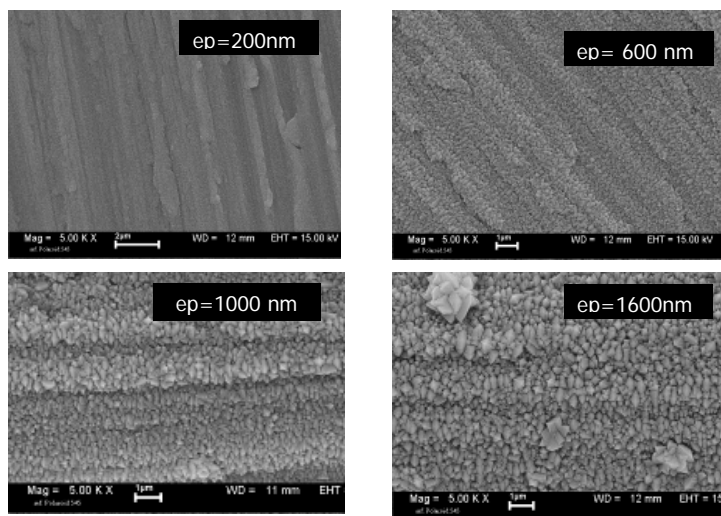
Pour étudier comment l'épaisseur du film de TiO<sub>2</sub> qui se développe sur le substrat de titane affecte la rugosité finale de la surface, cinq dépôts ont été réalisés dans des conditions identiques:  $T_d = 400^\circ\text{C}$ ,  $P = 20$  torr,  $\chi = 76 \times 10^{-6}$ , le temps de dépôt variant de 90 minutes pour obtenir un film épais de 200 nm à 500 minutes pour obtenir un film épais de 1600 nm. Les substrats de titane avaient été soumis à un polissage 180. Les valeurs enregistrées pour  $R_q$  sont comprises entre  $0,97 \pm 0,02$  μm pour le film le plus fin (~200nm) et  $1,84 \pm 0,30$  μm pour le plus épais (Figure 3.19).



**Figure 3.19.** Variation de la rugosité finale en fonction de l'épaisseur du dépôt

On observe sur la Figure 3.19 que, pour des épaisseurs supérieures ou égales à 1 μm environ, la rugosité enregistre un saut brusque vers des valeurs de l'ordre de 1,5μm. Les clichés MEB de la

Figure 3.20 montrent qu'à partir d'une épaisseur de 1  $\mu\text{m}$ , la dimension des cristaux augmente et qu'il se forme des amas cristallins sur la surface.



**Figure 3.20.** Clichés MEB de la surface d'échantillons de titane (poli initial 180), recouverts de différentes épaisseurs de  $\text{TiO}_2$

### 3.1.6. Énergie de surface mesurée par la technique du mouillage

Un autre paramètre intéressant à étudier est la mouillabilité de la surface. On y accède en mesurant l'angle de contact d'une goutte d'eau déposée sur la surface. Le caractère hydrophobe ou hydrophile de la surface d'un biomatériau a une influence majeure sur l'attachement des protéines d'adhésion des cellules (voir les remarques déjà faites dans le Chapitre 1).

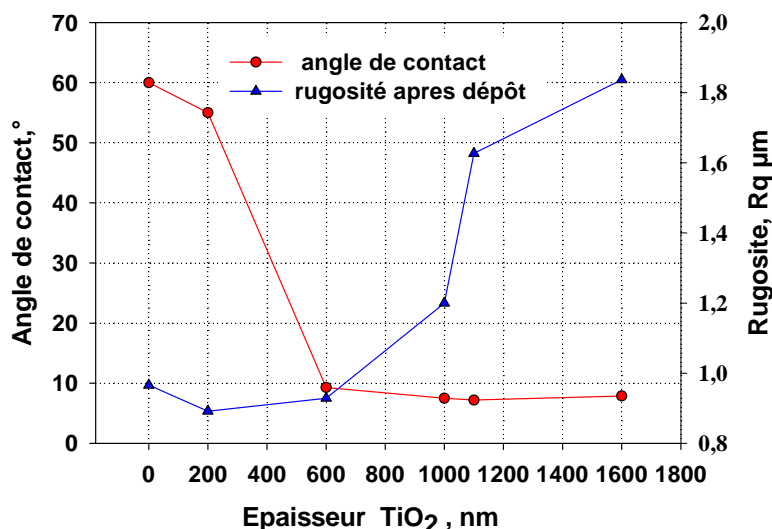
La technique de l'angle de contact fournit les informations suivantes :

- l'affinité du liquide utilisé pour la surface du solide étudié : si ce liquide est l'eau, on peut en déduire le caractère hydrophile (angle de contact faible), voire super hydrophile (angle de contact  $< 5^\circ$ ) ou, au contraire, hydrophobe (angle de contact élevé) de la surface ;
- l'énergie de surface, déduite de la mesure des angles de contact de plusieurs liquides, en considérant la composante dispersive et la composante polaire de l'énergie de surface.

#### 3.1.6.1. Relation entre la morphologie et la mouillabilité

La Figure 3.21 présente, en fonction de l'épaisseur du dépôt, la variation de l'angle de contact (échelle de gauche) et de la rugosité finale (échelle de droite) pour cinq films de  $\text{TiO}_2$  déposés par MOCVD sur du titane et pour une surface de titane non revêtue d'oxyde par MOCVD. Le caractère fortement hydrophile (angles de contact  $\leq 10^\circ$ ) des dépôts les plus épais (épaisseur  $\geq 600$  nm) correspond aux rugosités les plus fortes ( $> 1 \mu\text{m}$ ). A l'inverse, les dépôts peu épais (épaisseur  $< 600$  nm) ont une faible rugosité et un caractère hydrophobe marqué avec des angles de contacts compris entre  $55$  et  $60^\circ$ .





**Figure 3.21.** Variation de l'angle de contact et de la rugosité en fonction de l'épaisseur pour une surface de titane non traitée et cinq films de  $\text{TiO}_2$  déposés sur titane à  $400^\circ\text{C}$ , 20 torr, avec  $\chi = 76 \times 10^{-6}$ .

Le mode de croissance a également un effet spectaculaire sur la mouillabilité. La comparaison des angles de contact pour deux films d'épaisseur sensiblement voisine, l'un présentant un mode de croissance colonnaire (épaisseur  $2,0 \mu\text{m}$ ), l'autre un mode de croissance compact (épaisseur  $1,8 \mu\text{m}$ ) a donné le résultat suivant : structure colonnaire,  $\theta = 19^\circ$  ; structure compacte,  $\theta = 56^\circ$ .

Mais, outre la rugosité et le mode de croissance, un troisième facteur est susceptible de modifier la mouillabilité d'un film de  $\text{TiO}_2$  : le rayonnement lumineux.

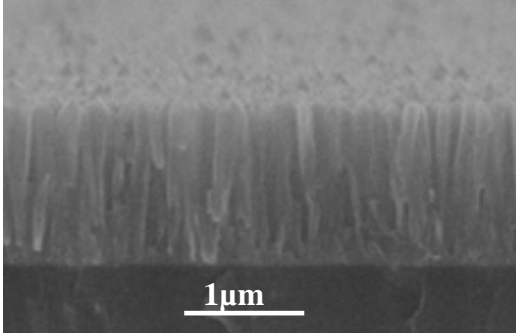
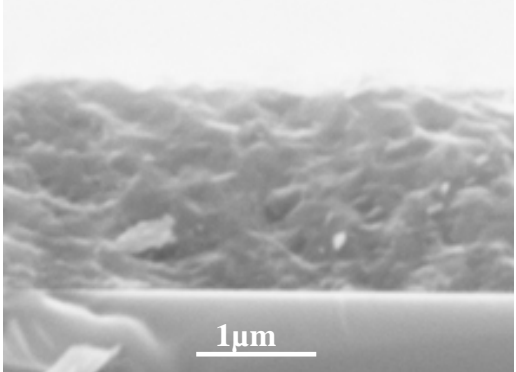
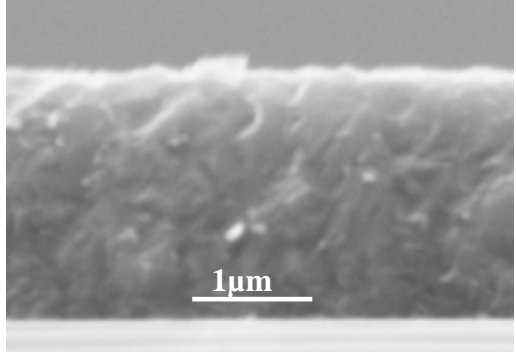
### 3.1.6.2. Influence du rayonnement lumineux sur la mouillabilité

L'exposition d'une surface de  $\text{TiO}_2$  au rayonnement UV (lampe ou lumière du jour) à l'atmosphère ambiante (présence de vapeur d'eau) augmente la teneur en groupements hydroxo sur cette surface à la suite d'une réaction photochimique sur les molécules d'eau adsorbées [3]. L'accroissement de la teneur en groupements OH favorise la mouillabilité de la surface qui devient ainsi plus hydrophile ou moins hydrophobe. Cette propriété est utilisée pour fabriquer des photocatalyseurs destructeurs de polluants organiques et des surfaces autonettoyantes.

Sous l'effet du rayonnement UV, et suivant la morphologie du film, l'angle de contact d'une goutte d'eau peut diminuer de quelques degrés pour les dépôts les plus hydrophiles à plusieurs dizaines de degrés pour les dépôts les moins hydrophiles (Tableau 3.7). Pour l'emploi de  $\text{TiO}_2$  comme biomatériau, il est important de ne pas négliger cet aspect photochimique puisque, comme il a été rappelé au début du paragraphe, la mouillabilité de la surface influence l'accrochage des cellules. Les échantillons préparés au cours de ce travail ont été conservés à l'abri du rayonnement solaire direct, dans une pièce éclairée artificiellement dans la journée.



**Tableau 3.7.** Influence d'une irradiation UV sur la mouillabilité de trois dépôts réalisés sur titane à 400°C, 1 torr de morphologies différentes. Les micrographies montrent des dépôts sur silicium, pour illustrer la morphologie transverse.

code	Mode de croissance : clichés MEB de sections transverses de dépôts sur silicium.	Epaisseur ( $\mu\text{m}$ )	$\theta$ (deg.) après dépôt	$\theta$ (deg.) après irradiation UV
T-50		2,0	19	12
T-57		1,8	56	30
T-56		2,5	76	30

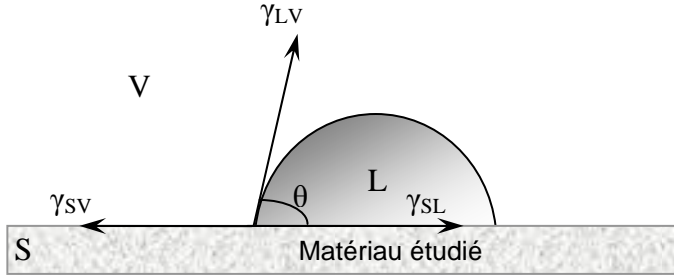
### 3.1.6.3. Calcul de l'énergie de surface

La forme d'une goutte en contact avec une surface plane dépend de trois paramètres (Figure 3.22) :

- la tension interfaciale solide- liquide  $\gamma_{SL}$
- la tension interfaciale solide – vapeur  $\gamma_{SV}$
- la tension interfaciale liquide – vapeur  $\gamma_{LV}$

Young a proposé une équation mathématique dans laquelle interviennent les trois tensions interfaciales au point de contact triphasique (Figure 3.22). L'angle de contact  $\theta$  est l'angle entre les vecteurs  $\gamma_{LV}$  et  $\gamma_{SL}$ . Les trois paramètres sont liés à l'angle de contact par l'équation du Young [4] :

$$-\gamma_{SV} + \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos \theta = 0$$



**Figure 3.22.** Schéma des forces agissant sur une goutte déposée à la surface d'un matériau.

Cette équation exprime l'équilibre mécanique des forces qui s'exercent au point de rencontre de trois interfaces. Seuls  $\gamma_{LV}$  et  $\theta$  sont mesurables. Pour calculer  $\gamma_{SV}$  et  $\gamma_{SL}$ , il a donc fallu développer des modèles. Le plus utilisé est celui de Owens et Wendt [5]. Ce modèle permet d'accéder aux paramètres de l'équation de Young et de calculer l'énergie de surface. Il considère que l'énergie de surface peut être exprimée comme la somme de deux termes :

$$\gamma_{SV} = \gamma_{SV}^d + \gamma_{SV}^p.$$

$\gamma_{SV}^d$  est la composante dispersive (interactions Lifshitz-Van der Waals) et  $\gamma_{SV}^p$  la composante non-dispersive (interactions polaires). La relation entre les composantes de tension et l'angle de contact devient donc :

$$\gamma_{LV} (1 + \cos \theta) = 2(\gamma_{SV}^d \cdot \gamma_{LV}^d)^{1/2} + 2(\gamma_{SV}^p \cdot \gamma_{LV}^p)^{1/2}$$

ou, sous une autre forme :

$$\frac{\gamma_{LV} (1 + \cos \theta)}{2 \cdot \sqrt{\gamma_{LV}^d}} = \sqrt{\gamma_{SV}^p} \cdot \frac{\sqrt{\gamma_{LV}^p}}{\sqrt{\gamma_{LV}^d}} + \sqrt{\gamma_{SV}^d}.$$

Cette équation montre que  $\frac{\gamma_{LV} (1 + \cos \theta)}{2 \cdot \sqrt{\gamma_{LV}^d}}$  est une fonction linéaire de  $\frac{\sqrt{\gamma_{LV}^p}}{\sqrt{\gamma_{LV}^d}}$ , ayant  $(\gamma_{SV}^p)^{1/2}$  pour pente

et  $(\gamma_{SV}^d)^{1/2}$  pour ordonnée à l'origine. L'énergie de surface est donc la somme de deux termes,  $\gamma_{SV}^p$  et  $\gamma_{SV}^d$ , que l'on peut obtenir par résolution graphique. Cette résolution graphique nécessite de connaître au minimum trois points et donc de mesurer l'angle de contact de trois liquides différents. Les liquides retenus dans ce travail sont : l'eau (liquide fortement polaire), le formamide et le diiodométhane (liquide fortement dispersif) (Tableau 3.8).

**Tableau 3.8.** Valeurs de la tension interfaciale  $\gamma_{LV}$  et de ses composantes dispersive  $\gamma_{LV}^d$  et polaire  $\gamma_{LV}^p$  pour les trois liquides retenus pour mesurer l'énergie de surface.

Liquides	$\gamma_{LV}$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\gamma_{LV}^d$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\gamma_{LV}^p$ (mJ/m <sup>2</sup> )
eau	72,8	21,8	51
formamide	58	39	19
diiodométhane	50,8	50,8	0

Les composantes polaire et dispersive ainsi que l'énergie de surface des trois dépôts présentés dans le Tableau 3.7 et d'une surface de titane non traitée par MOCVD sont présentées dans le Tableau 3.9, avec la contribution de la composante polaire à l'énergie totale (fractional polarity FP) [6]

**Tableau 3.9.** Angles de goutte des liquides de référence et énergies de surface (la somme des composantes polaire et dispersive) d'un échantillon de titane non traité et des trois dépôts de TiO<sub>2</sub> sur Ti présentés dans la Tableau 3.7.

code	eau	$\theta$ (deg.) formamide	diiodométhane	$\gamma_{SV}^p$ , mJ/m <sup>2</sup>	$\gamma_{SV}^d$ , mJ/m <sup>2</sup>	$\gamma_{SV}$ , mJ/m <sup>2</sup>	FP =
Ti non traitée	57	49	39	14	35	<b>49</b>	0,29
T-50	19	11	9	29	42	<b>71</b>	0,41
T-57	56	43	29	13	39	<b>52</b>	0,25
T-56	76	54	40	5	37	<b>42</b>	0,12

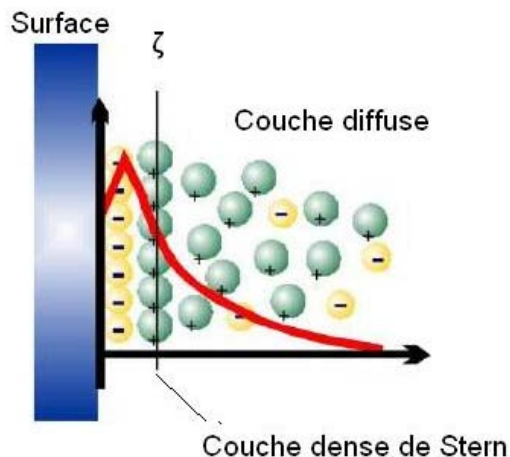
### 3.1.7. Charge de surface

La charge électrique de surface d'un biomatériau est considérée comme l'un des principaux facteurs physiques impliqués dans l'évolution biologique des tissus autour d'un implant. Cette charge dépend de plusieurs facteurs comme la composition chimique de surface du matériau, l'état inflammatoire des tissus, la composition du fluide biologique environnant, et son pH [7]. L'étude de la relation entre la chimie de surface, la charge électrique et l'absorption des protéines est essentielle pour la compréhension du mécanisme d'intégration biologique et permet d'améliorer la qualité des prothèses médicales.

#### 3.1.7.1. Origine du potentiel zêta

La charge électrique d'une surface se déduit de la valeur du *potentiel zêta*. Une des méthodes de mesure du potentiel zêta consiste à mesurer le *potentiel d'écoulement d'un électrolyte* [8-10]. La Figure 3.23 montre comment des espèces chargées de l'électrolyte se fixent en une double couche sur la surface du matériau. On distingue une couche compacte appelée couche de Stern et une couche diffuse. Si l'électrolyte est forcé de s'écouler tangentiellement à la surface, des espèces chargées présentes dans la double couche sont arrachées et entraînées sous l'effet de l'écoulement. L'électrolyte s'enrichit donc en charges électriques et il est possible de mesurer la différence de potentiel résultant de cet accroissement de charge. Le potentiel zêta ainsi mesuré est caractéristique de l'interface entre la couche de Stern et la couche diffuse [11]. Pour une valeur donnée du pH, une valeur positive du potentiel zêta révèle une surface chargée positivement, qui va donc attirer des espèces chargées

négativement, comme les anions ou des protéines. A l'inverse, une valeur négative du potentiel zêta reflète une charge négative qui va donc attirer des particules positives, cations et protéines chargées positivement.



**Figure 3.23.** Diagramme schématisé de la double couche électrique et localisation du potentiel zêta ( $\xi$ ). Ce potentiel est généré quand un fluide est forcé de s'écouler dans l'espace libre entre deux surfaces placées en vis à vis. Il est localisé à l'interface de la couche de Stern et de la couche diffuse. D'après Cai et al. [12]

### 3.1.7.2. Mesure du potentiel zêta

Pour mesurer le potentiel zêta, des échantillons de forme adaptée à la cellule de mesure ont été préparés. Des dépôts ont donc été réalisés sur des substrats de silicium, de dimensions  $2 \times 3 \text{ cm}^2$ . Cette surface est suffisamment petite pour obtenir une bonne homogénéité de dépôt de TiO<sub>2</sub> dans le réacteur de MOCVD utilisé, et suffisamment large pour effectuer une mesure significative du potentiel zêta. Le Tableau 3.10 présente les conditions opératoires de préparation des couches minces utilisées.

**Tableau 3.10.** Conditions opératoires d'élaboration des échantillons pour la mesure du potentiel  $\xi$ .

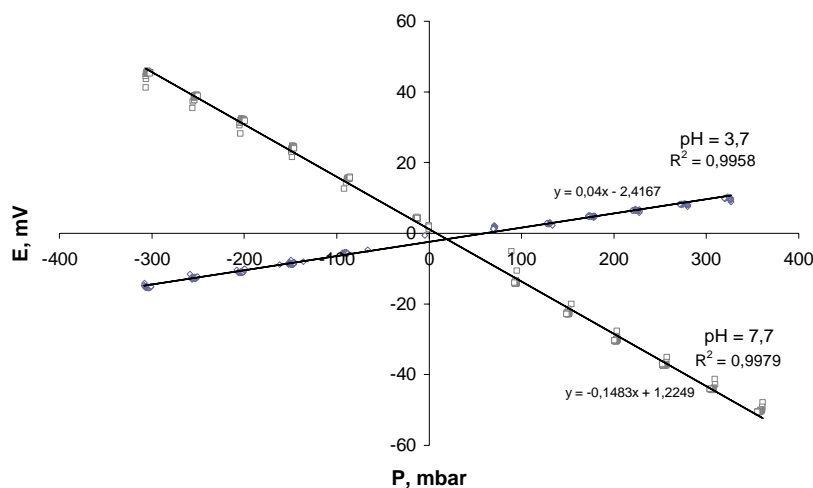
Echantillon	P <sub>tot</sub> (torr)	T <sub>dépôt</sub> (°C)	$\chi_{\text{TIP}} (10^{-6})$	Epaisseur (nm)	Morphologie
73-74	20	400	520	900	colonnaire
83-84	1	400	7200	2500	compacte

Le potentiel d'écoulement a été enregistré dans une solution de KCl  $10^{-3} \text{ M}$ , sur le domaine de pH 2,7 – 9. L'acidité a été ajustée avec de l'acide chlorhydrique 0,1M et la basicité avec une solution aqueuse d'hydroxyde de potassium 0,1M.

Dans les mesures de potentiel d'écoulement, on force une solution d'électrolyte à s'écouler entre les surfaces de deux dépôts identiques, placés en vis-à-vis et distants d'une fraction de millimètre (0,2 mm dans notre montage). L'appareil mesure la différence de potentiel entre l'entrée et la sortie de la zone d'écoulement. Le potentiel zêta est calculé automatiquement en utilisant la formule classique de Helmholtz – Smoluchowski :

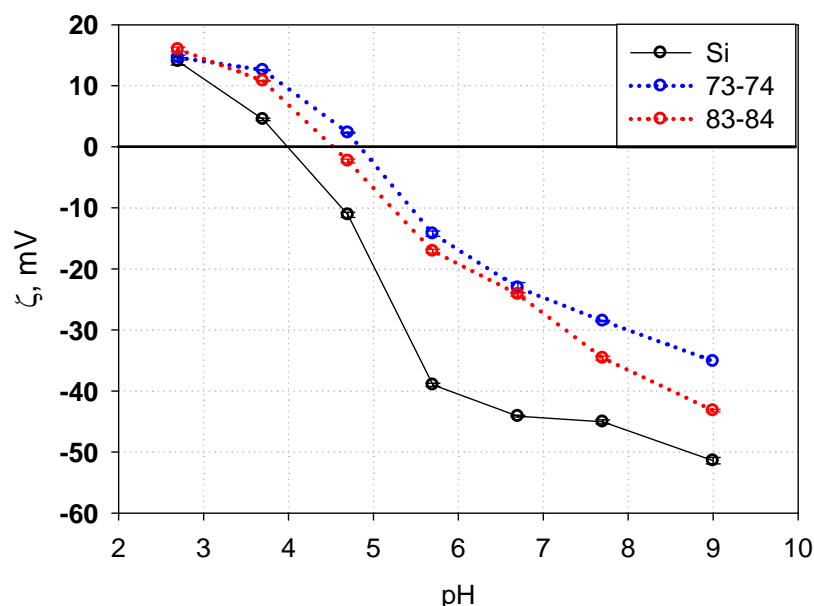
$$\xi = \frac{E}{P} \cdot \frac{(\eta \cdot \lambda)}{(\varepsilon \cdot \varepsilon_0)}$$

où  $\xi$  est le potentiel zêta,  $E$  le potentiel d'écoulement,  $\eta$  la viscosité dynamique,  $\lambda$  la conductivité électrique de la solution,  $P$  la différence de pression,  $\varepsilon$  la permittivité de la solution (constante diélectrique),  $\varepsilon_0$  la permittivité du vide.



**Figure 3.24.** La différence de potentiel enregistrée entre l'entrée et la sortie du fluide de la cellule en fonction de différence de pression appliquée pour les pH 3,7 et 7,7 (échantillons 83-84).

Le coefficient  $E/P$  de la formule ci-dessus est déduit de la pente de la droite  $E = f(P)$ . La Figure 3.24 présente un exemple de variation de la différence de potentiel en fonction de la différence de pression appliquée pour le couple d'échantillon 83-84, à deux valeurs de pH : 3,7 et 7,7. Les coefficients de corrélation sont 0,9958 pour le pH 3,7 et 0,9979 pour le pH 7,7.



**Figure 3.25.** Variation du potentiel zêta en fonction du pH d'une solution de  $\text{KCl } 10^{-3}\text{M}$  pour un échantillon de silicium, et les deux films de  $\text{TiO}_2$ .

La variation du potentiel  $\xi$  en fonction du pH pour un échantillon de silicium non revêtu et pour deux types de film de  $\text{TiO}_2$  est montrée sur la Figure 3.25. Chaque valeur de potentiel zêta est la valeur moyenne de trois mesures. La reproductibilité des mesures s'est révélée très satisfaisante. Pour

les trois types d'échantillons, on observe des variations importantes des valeurs du potentiel zêta en fonction du pH de la solution d'électrolyte.

Les mesures du potentiel zêta ont permis aussi de déterminer le point isoélectrique (PIE) (point où la courbe  $\xi = f(\text{pH})$  croise l'axe des pH). Le point isoélectrique pour les trois échantillons est compris entre 3,9 et 4,9 (Tableau 3.11).

**Tableau 3.11.** Valeurs du point isoélectrique pour la référence et les deux dépôts de TiO<sub>2</sub> étudiés

Référence (Si + SiO <sub>2</sub> natif)	Dépôt compact (83-84)	Dépôt colonnaire (73-74)
3,98	4,52	4,82

La valeur la plus basse, 3,98, est obtenue pour le silicium utilisé comme référence. On observe une différence entre les points isoélectriques des deux dépôts d'oxyde de titane : 4,52 pour le dépôt compact et 4,82 pour le dépôt colonnaire. On note également des potentiels légèrement plus négatifs pour le dépôt compact. Outre la différence de morphologie, ces différences pourraient également venir d'une différence de composition allotropique. En effet, dans la littérature, le point isoélectrique de TiO<sub>2</sub> est donné avec des valeurs comprises entre 3 et 6,6 pour l'anatase et entre 3,5 et 6 pour le rutile [8, 9, 13, 14]. Dans le cas présent, la diffraction des rayons X et la spectroscopie Raman montrent l'absence de rutile dans les dépôts testés. On ne peut donc pas imputer une différence de composition allotropique.

Il est également intéressant de comparer les valeurs des PIE observées avec celle de 4 trouvée pour un film de *titane natif* déposé sur verre par évaporation sous faisceau d'électrons mais inévitablement recouvert d'une couche d'oxygène et d'hydrocarbures du fait du contact avec l'atmosphère [8, 12], et celle de 4,3 mesurée pour un oxyde TiO<sub>2</sub> dit *amorphe*, déposé sur silicium par pulvérisation (RF magnétron) de titane en atmosphère argon-oxygène [15]. Roessler et al. [8] ont également mesuré les potentiels zêta pour des films de passivation et anodique sur Ti6Al4V et Ti. Pour ces deux types de TiO<sub>2</sub> amorphe, aucune différence n'a été observée, la valeur du PIE se situant à 4,4.

En terminant, remarquons que les nombreux passages de la solution dans le canal d'écoulement, avec des gradients de pression allant de 12 à 400 mbar, n'ont pas altéré la surface des dépôts. Ni écaillage, ni délamination n'ont été observés par examen au MEB.

### 3.1.8. Vers la réalisation de dépôts à gradient de compacité (GdC)

Les films préparés par MOCVD dans les conditions décrites jusqu'à présent ont une structure homogène sur toute l'épaisseur : soit une morphologie transversale compacte, soit une structure poreuse (colonnaire), avec des colonnes plus ou moins fines. La structure adoptée par le film influence ses propriétés : énergie de surface, rugosité, adsorption d'ions, adhérence, etc. Des études sur l'oxyde de titane ont mis en évidence cette influence de la microstructure : une structure poreuse peut faciliter

l'incorporation d'ions minéraux, très importants dans l'interaction entre l'implant de titane et le milieu biologique [16] ; un film compact peut être une barrière chimique efficace contre la libération d'ions métalliques, éventuellement toxiques, provenant de l'implant [17]. Dans le même ordre d'idée, on peut également penser que la protection du substrat contre la corrosion par les fluides biologiques sera d'autant meilleure que le film sera compact.

L'idée de gradient de compacité pour les films de TiO<sub>2</sub> se trouve déjà dans le travail de Zhu et al [18], dans le quel les films sont produits par oxydation micro-arc (MAO) : un film poreux à l'extérieur et un film compact à l'interface avec le substrat, dans le but d'améliorer la biocompatibilité de l'implant, la bioactivité, les propriétés biologiques pour l'ingénierie tissulaire et la résistance à la corrosion. Les tests cellulaires ont indiqué que cellules fibroblastes avaient une bonne adhérence et une vitesse de prolifération importante.

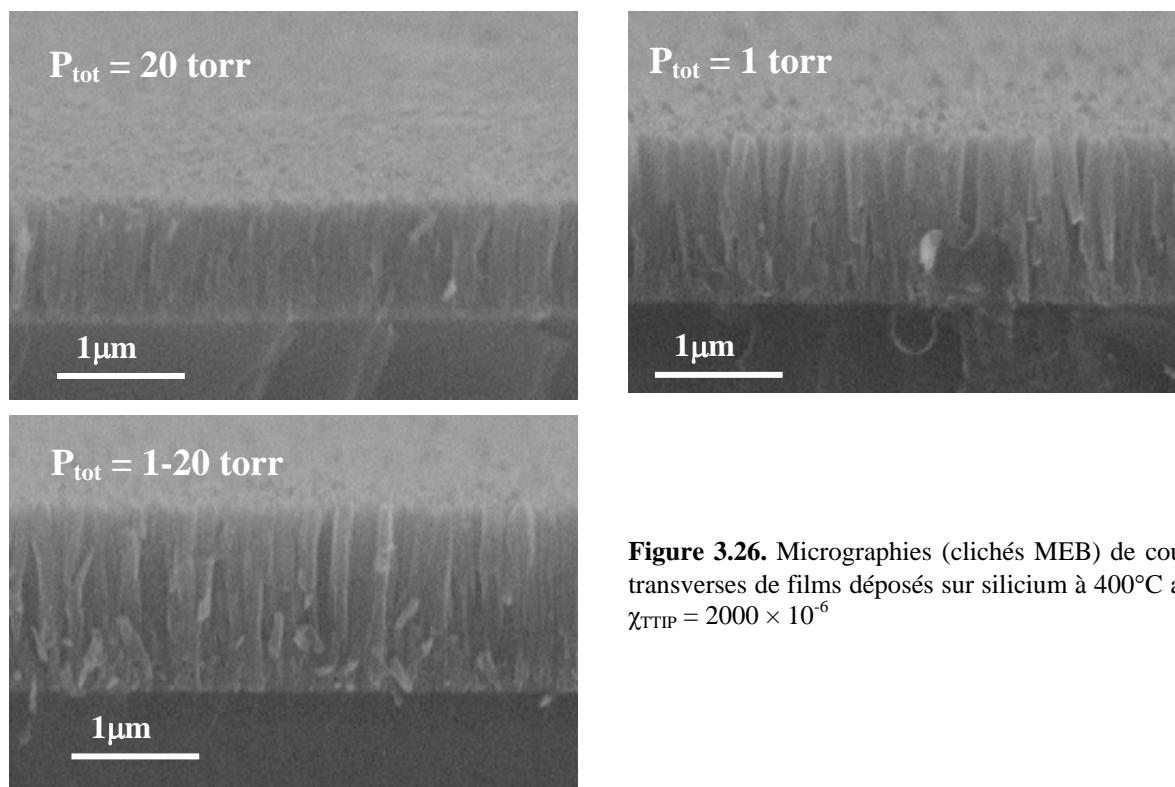
La méthode MOCVD, par la modulation possible des différents paramètres expérimentaux : nature du réacteur, nature du précurseur, température de dépôt, pression, fraction molaire du précurseur, utilisation d'un gaz réactif, durée de la croissance, permet d'obtenir une diversité de morphologies de dépôt. Nous avons cherché à utiliser cette possibilité pour préparer des dépôts à gradient de compacité (GdC) : au cours de la préparation d'un dépôt il doit être possible, en faisant varier la fraction molaire du précurseur et la pression totale, séparément ou simultanément, d'obtenir une compacité variable dans l'épaisseur du dépôt, par exemple un film compact au niveau de la couche interne en contact avec le substrat et poreux dans sa couche externe en contact avec le milieu biologique. Trois essais, conduisant à des résultats divers, ont été réalisés.

**Essai n°1** – Cette première tentative a été réalisée à fraction molaire constante, sous une pression de 1 torr dans un premier temps, puis de 20 torr dans un second temps. Le dépôt final s'est avéré être colonnaire sur toute son épaisseur. Cet échec est venu du fait que nous n'avions pas encore l'expérience des dépôts à 1 torr. En particulier, nous n'avions pas encore constaté que l'influence de la fraction molaire sur la structure du dépôt s'inverse quand on passe de 20 torr à 1 torr, comme cela a été souligné plus haut.

**Tableau 3.12.** Conditions opératoires du premier essai d'obtention d'une structure GdC (voir texte).

code	morphologie visée	P <sub>tot</sub> , (torr)	T (°C)	Q <sub>dil</sub> (sccm)	Q <sub>vec</sub> (sccm)	χ (10 <sup>-6</sup> )	t <sub>TIP</sub> (°C)	t <sub>dépôt</sub> (min)	morphologie finale
T-49	colonnaire	20	400	300	20	1900	60	25	colonnaire
T-50	compacte	1	400	300	15	2000	25	100	colonnaire
T-51	GdC	1	400	300	15	2000	25	35	colonnaire
		2			15		32	32	
		5			15		44	10	
		10			15		54	5	
		20			20		60	10	

Le Tableau 3.12 présente les conditions utilisées pour réaliser ce dépôt et, comparativement, les résultats obtenus pour des dépôts à 20 torr et à 1 torr avec la même fraction molaire que dans la tentative d'un dépôt GdC. Les clichés MEB de la Figure 3.26 illustrent l'identité des trois morphologies.



**Figure 3.26.** Micrographies (clichés MEB) de coupes transverses de films déposés sur silicium à 400°C avec  $\chi_{\text{TIP}} = 2000 \times 10^{-6}$

La logique scientifique aurait voulu que l'échantillon T50 (1 torr) fût examiné en microscopie électronique avant de préparer l'échantillon GdC T51. Cela n'a pas été possible pour des raisons pratiques. Néanmoins, l'expérience effectuée à 1 torr fut le premier indice que, à basse pression, pour une fraction molaire de  $2000 \times 10^{-6}$ , la croissance est de type colonnaire. C'est à partir de ce constat inattendu qu'a été entreprise l'étude d'échantillons préparés sous 1 torr.

**Essai n°2** – Pour le deuxième essai on a considéré le domaine de fraction molaire dans lequel il est possible d'obtenir des films très compacts. Comme dans le premier essai, trois films ont été élaborés. Les conditions sont présentées dans le Tableau 3.13 :

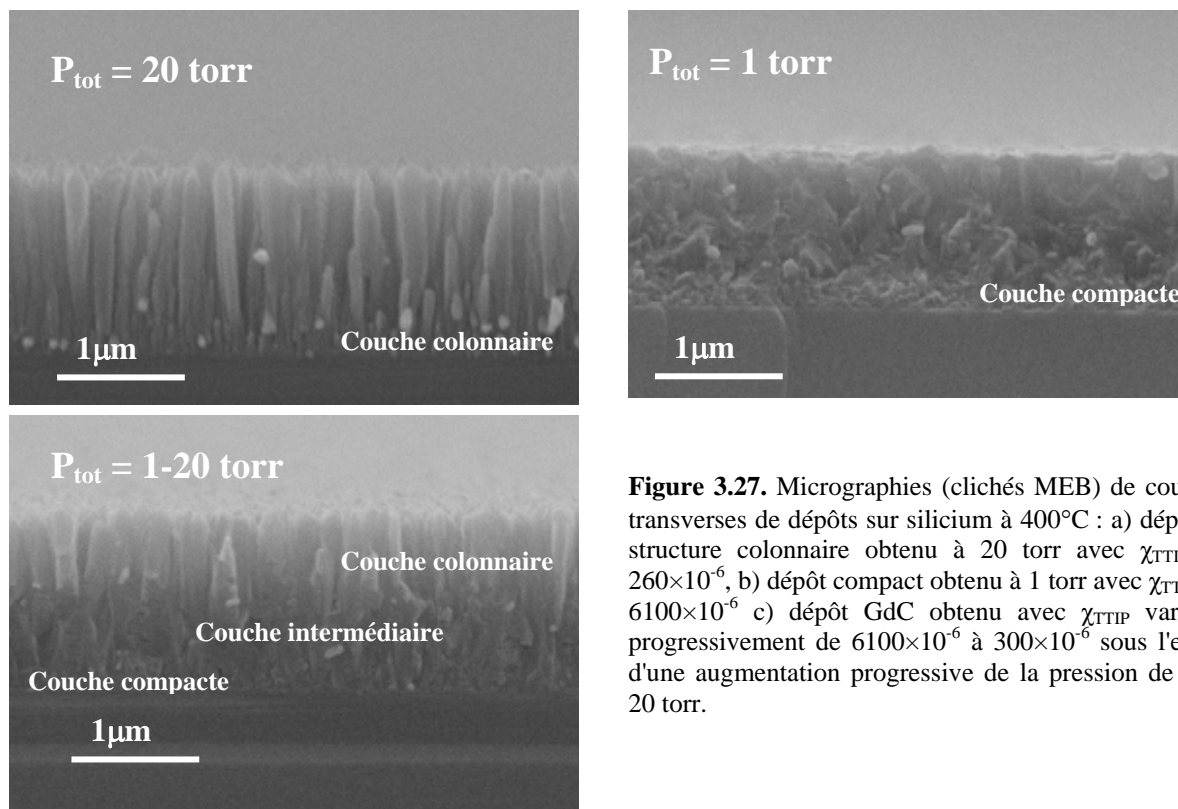
Dans cette deuxième tentative, on a choisi de varier la pression au cours du dépôt, en partant de 1 torr et jusqu'à 20 torr, en cinq paliers successifs. Dans le même temps, les débits de gaz vecteur et gaz de dilution ont été maintenus constants, entraînant une diminution de la fraction molaire du précurseur.

**Tableau 3.13.** Conditions opératoires pour la deuxième préparation d'un dépôt GdC (T-62), en partant des conditions du dépôt compact T-61 et en allant progressivement vers les conditions du dépôt colonnaire T-60.

code	morphologie visée	$P_{\text{tot}}$ (torr)	T (°C)	$Q_{\text{dil}}$ (sccm)	$Q_{\text{vec}}$ (sccm)	$\chi$ ( $10^{-6}$ )	$t_{\text{TIP}}$ (°C)	$t_{\text{dépôt}}$ (min)	morphologie finale
T-60	colonnaire	20	400	575	20	260	41	200	colonnaire
T-61	compacte	1	400	575	25	6100	40	60	compacte
T-62	GdC	1	400	575	25	6100	40	35	GdC
		2			25	3000		8	
		5			25	1200		10	
		10			25	600		20	
		20			25	300		65	



Les clichés MEB de la Figure 3.27 montrent que ce deuxième essai a été couronné de succès en aboutissant à trois structures morphologiquement différentes : une structure colonnaire obtenue à 20 torr, une structure compacte obtenue à 1 torr et une structure GdC obtenue en faisant varier la pression de 1 à 20 torr. Le dépôt présente une couche compacte à l'interface avec le substrat et une couche intermédiaire qui adopte progressivement une structure colonnaire vers la partie supérieure du film.

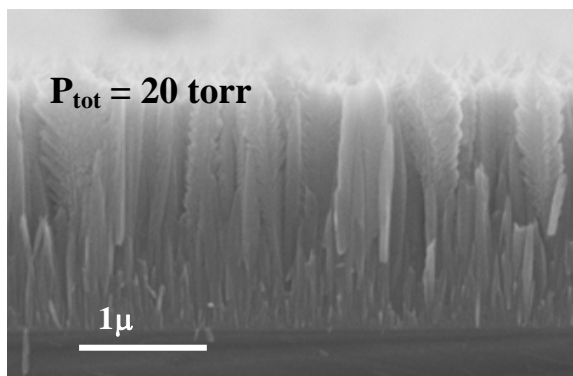


**Figure 3.27.** Micrographies (clichés MEB) de coupes transverses de dépôts sur silicium à 400°C : a) dépôt à structure colonnaire obtenu à 20 torr avec  $\chi_{\text{TTIP}} = 260 \times 10^{-6}$ , b) dépôt compact obtenu à 1 torr avec  $\chi_{\text{TTIP}} = 6100 \times 10^{-6}$  c) dépôt GdC obtenu avec  $\chi_{\text{TTIP}}$  variant progressivement de  $6100 \times 10^{-6}$  à  $300 \times 10^{-6}$  sous l'effet d'une augmentation progressive de la pression de 1 à 20 torr.

**Essai n°3** – Dans cette troisième préparation, la pression a été maintenue constante. Seule la fraction molaire a été variée au cours du dépôt, en jouant sur la température du précurseur. Les conditions sont présentées dans le Tableau 3.14 :

**Tableau 3.14.** Conditions opératoires pour la troisième préparation d'un dépôt GdC (T-81) : on fait varier la fraction molaire du précurseur tout en maintenant la pression constante.

code	morphologie visée	$P_{\text{tot}}$ , (torr)	T (°C)	$Q_{\text{dil}}$ (sccm)	$Q_{\text{vec}}$ (sccm)	$\chi$ ( $10^{-6}$ )	$t_{\text{TTIP}}$ (°C)	$t_{\text{dépôt}}$ (min)	morphologie finale
T-81	GdC	20	400	575	20	76	25	240	GdC
						260	41	60	
						1035	60	60	

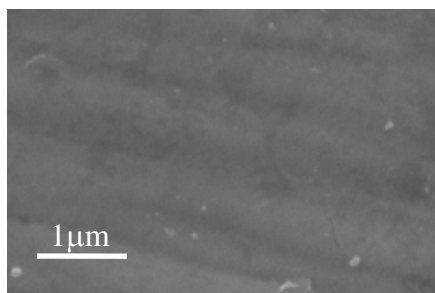


**Figure 3.28.** Micrographie (cliché MEB) d'une coupe transverse du dépôt GdC sur silicium obtenu à  $400^\circ\text{C}$ , 20 torr, en faisant varier  $\chi_{\text{TIP}}$  de  $76 \times 10^{-6}$  à  $1035 \times 10^{-6}$

La micrographie MEB de la Figure 3.28 montre que la microstructure du dépôt varie avec l'épaisseur. Cependant, contrairement au dépôt GdC précédent, le mode de croissance est constamment colonnaire. On peut cependant parler encore de gradient de compacité dans la mesure où la dimension moyenne des colonnes augmente avec l'épaisseur du film. On distingue, à partir de la surface du substrat, une couche interne épaisse d'environ  $0,5 \mu\text{m}$ , faite de colonnes minces et compactes. Au-delà, les colonnes s'élargissent très rapidement et semblent présenter un aspect dendritique.

### 3.2. Films de $\text{TiO}_2$ obtenus par oxydation anodique

Des films d'oxyde de titane ont été préparés par le processus d'anodisation décrit en 2.1.2, sur des surfaces de titane polis 4000. Ils sont très minces, épais d'environ  $50\text{nm}$ . Les films d'oxyde de titane préparés par anodisation à des voltages inférieurs à  $50\text{V}$ , dans des solutions d'acide sulfurique ou acide ortho phosphorique ou dans des solutions physiologiques simulées, sont en général compacts. La figure 3.29 montre la morphologie de la surface d'un échantillon de Ti poli 4000, et anodisé dans une solution d'acide ortho phosphorique.



**Figure 3.29.** Cliché MEB sur la surface d'un échantillon de titane anodisé

Les films ont une morphologie compacte et uniforme : on ne voit pas des grains sur la surface comme c'est le cas pour les films déposées par MOCVD. Les films suivent le contour de la surface : leur rugosité est donc celle du substrat.

Ces films ne diffractent pas les rayons X. Avec un angle de contact de  $30^\circ$ , ils se classent parmi les dépôts moyennement hydrophiles. Leur adhérence n'est pas mesurable par la méthode du scratch test à cause de la faible épaisseur.

## Références

1. C. Sarantopoulos, Photocatalysateurs à base de TiO<sub>2</sub> préparés par infiltration chimique en phase vapeur (CVI) sur supports microfibreux. 2007, Institute Nationale Polytechnique: Toulouse. p. 204.
2. A. Bagnò, C di Bello, Surface treatments and roughness properties of Ti - based biomaterials. *Journal of Materials Science*, 2004. 15: p. 935-949.
3. J.M. Herrmann, Heterogenous photocatalysis: fundamentals and application to the removal of various type of aqueous pollutants. *Catalysis Today*, 1999. 53: p. 115-129.
4. T. Young, An essay on the cohesion of fluids. *Phil. Trans. R. Soc. London*, 1805. 95: p. 65-87.
5. D.K. Owens, R.C. Wendt, Estimation of the surface free energy of polymers. *J. Appl. Polym. Sci.*, 1969. 13: p. 1741– 1747.
6. N. Hallab, K. Bundy, K. O'Connor, R. Clark, R. Moses, Cell adhesion to biomaterials: correlations between surface charge, surface roughness, adsorbed protein and cell morphology. *J. Long-Term Eff. Med. Implants*, 1995. 53: p. 209- 231.
7. A. Krajewski, A. Piancastelli, R. Malavolti, Albumin adhesion on ceramics and correlation with their Z-potential. *Biomaterials*, 1998. 19: p. 637 - 641.
8. S. Roessler, R. Zimmermann, D. Scharnweber, C. Werner, H. Worch, Characterization of oxide layers on Ti6Al4V and titanium by streaming potential and streaming current measurements. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2002. 26: p. 387-395.
9. R. Viitala, M. Jokinen, T. Peltola, K. Gunnelius, J.B. Rosenholm, Surface properties of in vitro bioactive and non-bioactive sol-gel derived materials. *Biomaterials*, 2002. 23: p. 3073-3086.
10. W.Y. Wang, Y.K., Effects of solution pH and UV irradiation on the streaming potential of the titanium dioxide membranes. *Journal of Membrane Science*, 2006. 282: p. 342-350.
11. A. Krajewski, R. Malavolti, A. Piancastelli, Albumin adhesion on some biological and non-biological glasses and connection with their Z-potentials. *Biomaterials*, 1996. 17: p. 53-60.
12. K. Cai, M. Frant, J. Bossert, G. Hildebrand, K. Liefeth, K. D. Jandt, Surface functionalized titanium thin films: Zeta-potential, protein adsorption and cell proliferation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2006. 50: p. 1-8.
13. M. Herrmann, H.P. Boehm, *Z. f. Anorg. U Allg. Chem.*, 1969. 368 p. 73.
14. G.A. Parks, *Chem. Rev.*, 1965. 65: p. 177.
15. A. Feiler, P. Jenkins, J. Ralston, Metal oxide surfaces separated by aqueous solutions of linear polyphosphates : DLVO and non-DLVO interaction forces. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2000. 2: p. 5678 - 5683.
16. J. Pan, H. Liao, C. Leygraf, D. Thierry, J. Li, Variation of oxide films on titanium induced by osteoblast-like cell culture and the influence of an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pretreatment. *J Biomed Mater Res A*, 1998. 40(2): p. 244 - 256.
17. X. Nie, E. I. Meletisa, J. C. Janga, A. Leylandb, A. L. Yerokhinb, A. Matthews, Abrasive wear/corrosion properties and TEM analysis of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> coatings fabricated using plasma electrolysis. *Surf Coat Technol*, 2002. 149 (2-3): p. 245-251.
18. L. Zhu, X. Ye, G. Tang, N. Zhao, Y. Gong, Y. Zhao, J. Zhao, X. Zhang, Corrosion test, cell behavior test, and in vivo study of gradient TiO<sub>2</sub> layers produced by compound electrochemical oxidation. *J Biomed Mater Res* 2006. 78A: p. 515-522.

## Chapitre IV - Adhérence et protection contre la corrosion

## Chapitre IV – Adhérence et protection contre la corrosion

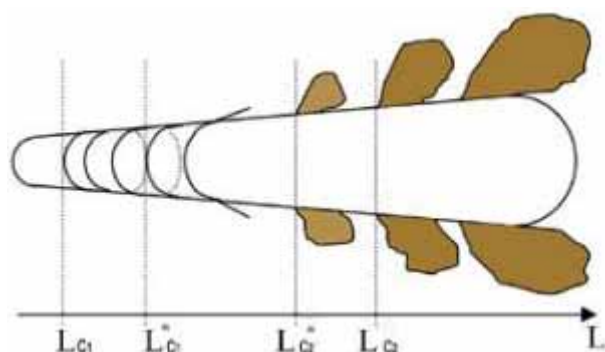
Après avoir présenté les caractérisations microstructurales et physico-chimiques, nous allons continuer par la caractérisation de deux propriétés importantes pour un matériau implantable, qui concernent l'interface matériau / dépôt. Il s'agit de l'adhérence du film d'oxyde sur le titane d'une part et de la capacité de ce film à protéger le titane contre la corrosion, d'autre part. En effet, une fois en place dans le corps, un implant est soumis à des sollicitations mécaniques diverses susceptibles d'arracher le dépôt – par exemple un frottement sur une partie osseuse. Il est également soumis à la réactivité chimique de fluides biologiques comme la salive ou le sérum. Il est donc important de tester la tenue mécanique et le caractère protecteur contre la corrosion des films déposés.

### 4.1. L'adhérence des films

L'une de propriétés de base d'un substrat recouvert est l'adhérence du film sur le substrat : en effet, il est important d'éviter au maximum tout arrachage du film après implantation, lors d'éventuels frottements sur les parties osseuses. Il existe plusieurs méthodes pour évaluer la résistance inter-faciale d'un film sur un substrat : indentation, méthode *pull-off*, méthode *shockwave-loading*, méthode du *scratch test*. Cette dernière méthode est principalement un test comparatif. C'est la méthode la plus commune pour évaluer l'adhérence d'un film sur le substrat.

Il est difficile d'exprimer l'adhérence de manière quantitative car la charge critique,  $L_c$ , dépend de plusieurs paramètres qui sont affectés par les conditions du test et du système revêtement-substrat [1]. Le *scratch test* ou test de la rayure fournit des informations quantitatives sur les modes de rupture des dépôts et la friction.

Différents modes d'endommagement [2] peuvent être observés sur la surface du dépôt (Figure 4.1) : l'apparition des premières fissures en arc de cercle à l'arrière de l'indenteur est notée  $L_{C1}$  : elle correspond au relâchement des contraintes en tension induites par les forces de frottement de l'indenteur. Dans le cas où l'échantillon est ductile, des fissures s'initient à l'avant de la pointe, au sommet du bourrelet frontal et sont notées  $L_{C1*}$ . La charge critique  $L_{C2*}$  correspond à l'écaillage cohésif qui intervient sous l'effet de la propagation des fissures dans le dépôt à une profondeur inférieure à l'épaisseur du dépôt. Enfin, lorsque les fissures se propagent à l'interface substrat-dépôt, les écailles sont dites adhésives et la charge critique correspondante est  $L_{C2}$ . L'écaillage intervient pour minimiser l'énergie élastique emmagasinée à cause des contraintes compressives devant l'indenteur.



**Figure 4.1.** Modes d'endommagement observables après le passage de la pointe diamant avec une charge normale croissante

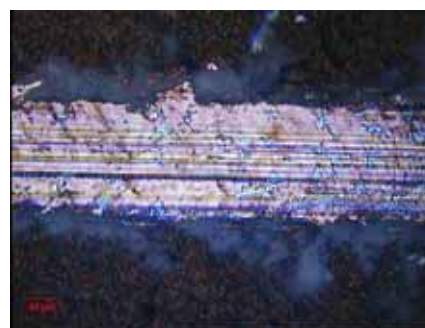
Parce que les films ont des morphologies différentes, nous avons choisi trois films épais d'environ 2000 nm, présentant trois types de morphologie structurale : film dense, film colonnaire et film à gradient de porosité. Les propriétés d'adhérence ont été évaluées aussi pour deux autres films moins épais.

Dans la suite,  $L_{c_{fiss}}$  désigne la charge la plus faible pour laquelle apparaissent les premières fissurations ;  $L_{c_{ecaill}}$  correspond à l'apparition des premières écailles ; enfin, pour une charge  $L_{c_{tot}}$ , la couche est totalement délamинée.

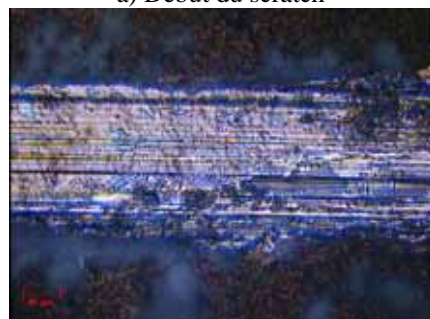
**a) Test d'adhérence sur un film à structure colonnaire** (Figure 4.2.) : l'échantillon testé (T-60) a été élaboré à 400°C, 20 torr, avec  $\chi = 260 \times 10^{-6}$  ; épaisseur : 1700 nm.



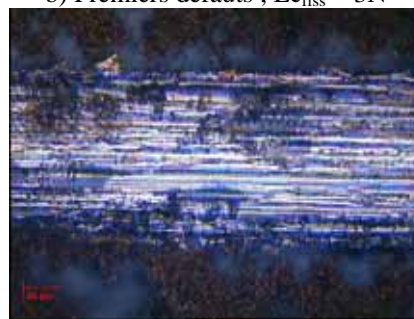
a) Début du scratch



b) Premiers défauts ;  $L_{c_{fiss}} = 3N$



c) Début de delamination ;  $L_{c_{ecaill}} = 6,37N$



d) Délamination totale  $L_{c_{tot}} = 8N$

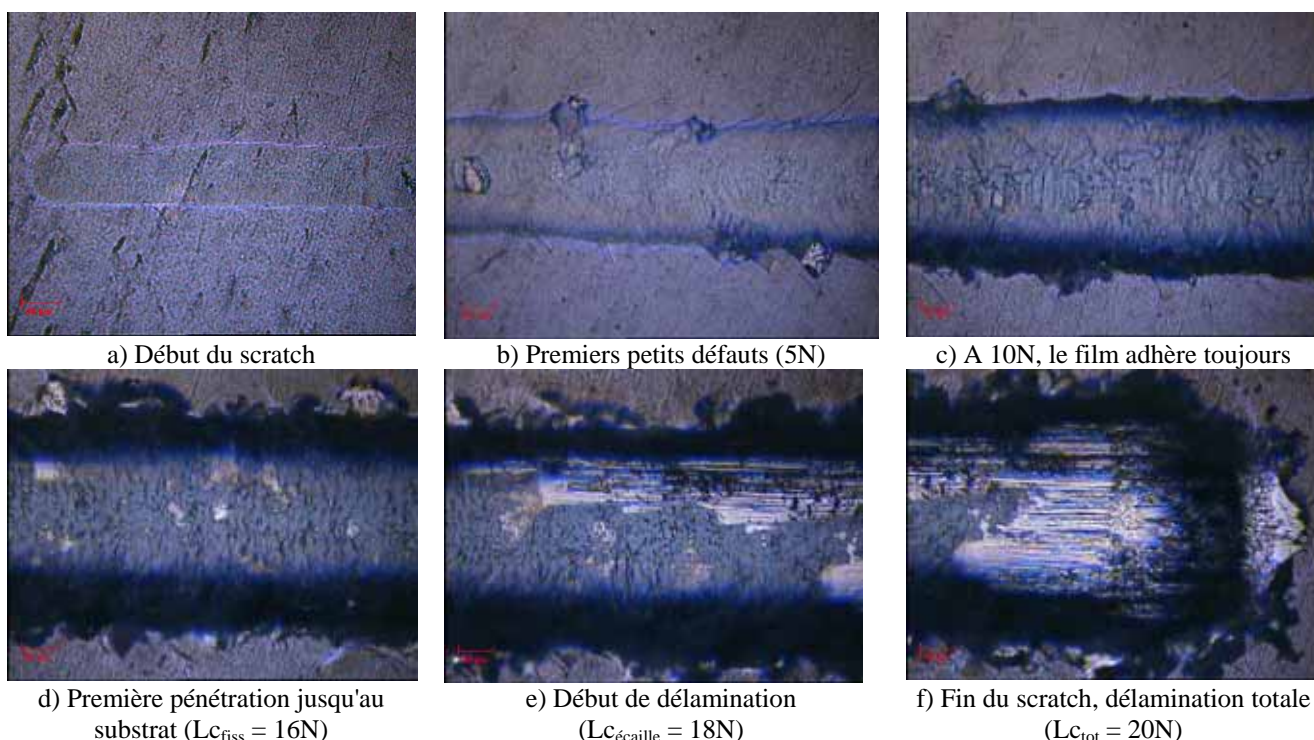
**Figure 4.2.** Micrographies en microscopie optique des différentes étapes du scratch test sur un film de  $TiO_2$  à structure colonnaire.



**Figure 4.3.** Variation des paramètres (force normale, force de frottement, émission acoustique et profondeur de pénétration) pendant un scratch test sur un film de TiO<sub>2</sub> à structure colonnaire

Le revêtement T-60 résiste à l'arrachement jusqu'à une charge de 6 N (Figure 4.3). La délamination commence à se produire au-delà. Les premiers écaillages à l'interface se produisent à  $L_{c_{\text{ecail}}} = 3 - 4$  N. Le substrat est complètement mis à nu à  $L_{c_{\text{tot}}} = 8$  N. Ces valeurs placent ce type de film dans la catégorie de films moyennement adhérents. Rappelons que la morphologie est poreuse et peu compacte.

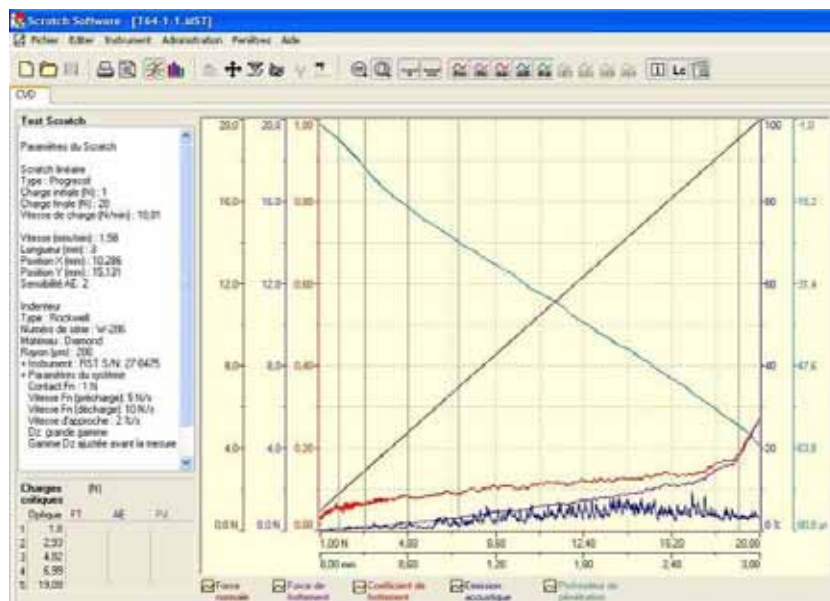
**b) Test d'adhérence sur un film à structure compacte** (Figure 4.4) : l'échantillon testé (T-64) a été élaboré à 400°C, 1 torr, avec  $\chi = 70000 \times 10^{-6}$  ; épaisseur : 2000 nm.



**Figure 4.4.** Micrographies en microscopie optique pour le scratch test sur un film de TiO<sub>2</sub> de structure dense : diverses étapes du début du scratch jusqu'à la délamination totale du film



Pour ce revêtement de  $\text{TiO}_2$  épais de  $2\ \mu\text{m}$  et de structure très compacte, les résultats sont beaucoup plus satisfaisants que précédemment (Figure 4.5). Les premiers signes d'arrachement apparaissent à 5N, mais les décollements les plus importants sont enregistrés vers une valeur de 18N, quand on commence à voir le substrat. Le film est complètement délaminé à  $L_{c_{\text{tot}}} = 20\text{N}$ .



**Figure 4.5.** Variation des paramètres (force normale, force de frottement, émission acoustique et profondeur de pénétration) pendant un scratch test sur un film de  $\text{TiO}_2$  de structure dense

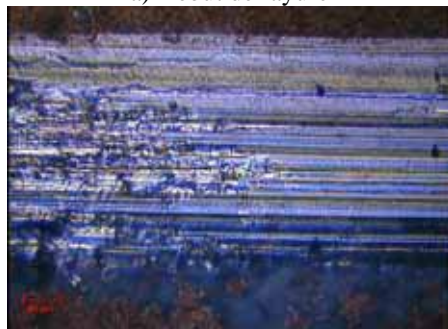
c) Test d'adhérence sur un film à structure à gradient de compacité (Figure 4.6) : l'échantillon testé (T-62) a été élaboré à  $400^\circ\text{C}$ , en faisant varier la pression de 1 à 20 torr et la fraction molaire de 6000 à  $300 \times 10^{-6}$ ; épaisseur : 2000 nm.



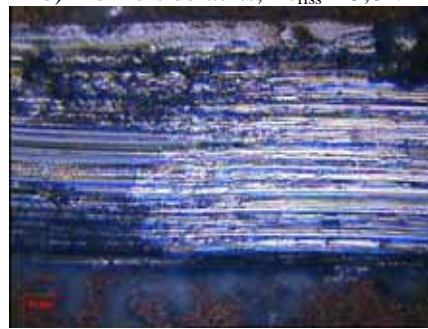
a) Début de rayure



b) Premiers défauts,  $L_{c_{\text{fiss}}} = 5,8\text{N}$



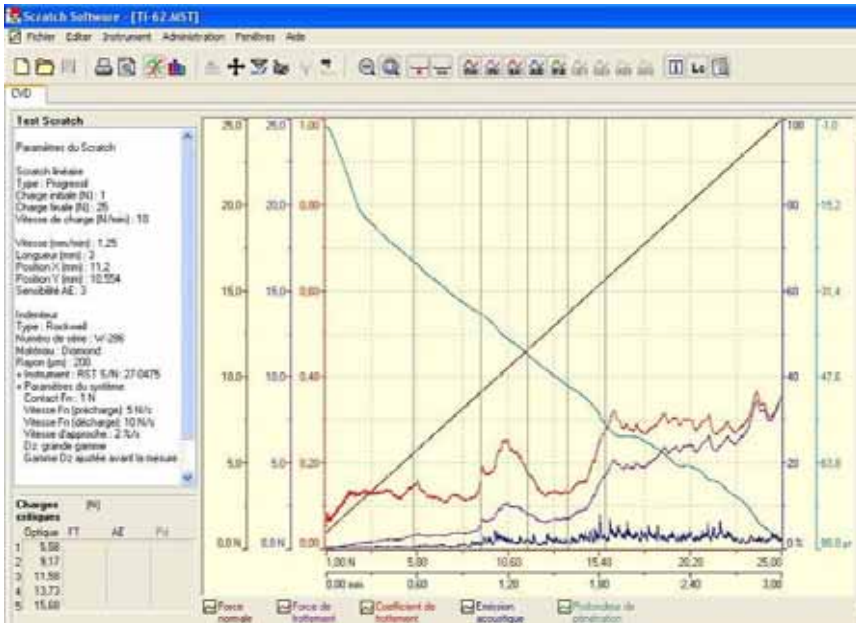
c) Début de delamination,  $L_{c_{\text{ecaill}}} = 11\text{N}$



d) Délamination totale,  $L_{c_{\text{tot}}} = 15\text{N}$

**Figure 4.6.** Micrographies en microscopie optique du scratch test sur un film de  $\text{TiO}_2$  à structure gradient de compacité : diverses étapes du début du scratch jusqu'à la délamination totale du film





**Figure 4.7.** Variation des paramètres (force normale, force de frottement, émission acoustique et profondeur de pénétration) pendant un scratch test sur un film de  $\text{TiO}_2$  à structure gradient de compacité.

Pour le film à gradient de compacité, les charges critiques ( $L_c$ ) situent ce type de structure entre le film compact et le film colonnaire (Figure 4.7). Nous verrons plus loin que dans les films "gradient", la zone du film qui adhère au substrat a une structure compacte. Cette partie compacte contribue de façon importante à la résistance du film à l'arrachement. Le film montre le même mode d'endommagement que les deux autres types de film. Seules diffèrent les valeurs des charges auxquelles apparaissent les endommagements successifs. Les premiers écaillages à l'interface se produisent à  $L_{c_{\text{écaill}}} = 6 \text{ N}$ . La délamination commence vers  $L_{c_{\text{écaill}}} = 11 \text{ N}$  pour. Le substrat est complètement mis à nu à  $L_{c_{\text{tot}}} = 15 \text{ N}$ .

Pour tous les échantillons, la délamination du film se fait progressivement sous l'avancée de l'indenteur et l'augmentation graduée de la force. On détecte peu d'émission acoustique aux faibles charges. A partir de  $L_{c_{\text{écaill}}}$ , des pics d'émission acoustique sont détectés régulièrement, correspondant à l'écaillage dans et en dehors de la trace (Figures 4.3, 4.5, 4.7).

Le test de la rayure a été effectué aussi sur deux films moins épais, l'un de structure colonnaire, épais de 1200nm, le second de structure compacte, épais de 500nm. Les valeurs obtenues pour les charges critiques sont reportées dans le Tableau 4.1. Même si elles sont inférieures à celles des premiers dépôts testés, ces valeurs sont raisonnables pour les applications envisagées.

Le Tableau 4.1 récapitule les paramètres mesurés par la méthode du scratch test et les met en regard avec les conditions de préparation des films testés et leurs caractéristiques morphologiques.

A notre connaissance, il n'existe pas dans la littérature de valeurs précises pour les charges critiques dans le cas de films de  $\text{TiO}_2$  déposé par MOCVD. Quelques valeurs ont été rapportées pour des films de  $\text{TiO}_2$  obtenus par oxydation sous micro-arc (MAO). Dans leur étude, Chen et al. [3] ont étudié les propriétés d'un film poreux d'oxyde obtenu par MAO destiné à des applications de biocompatibilité. La charge critique enregistré est de 36 N, pour une épaisseur de  $\text{TiO}_2$  de  $\sim 20 \mu\text{m}$ .

Dans un autre travail, Zhu et al. [4] ont testé l'adhérence de deux films de  $\text{TiO}_2$  préparés par MAO : une charge de délamination de 40,2 N a été mesurée pour un film poreux, épais de 16  $\mu\text{m}$  ; pour le second film, épais de 1  $\mu\text{m}$ , les auteurs n'ont pas pu obtenir une mesure.

**Tableau 4.1.** Mise en regard des paramètres mesurés par la méthode du scratch test avec les conditions de préparation et les caractéristiques morphologiques des dépôts testés.

Code échantillon	T-60	T-64	T-62	T-66-1	T-67-1
<b>Paramètres d'élaboration du dépôt</b>					
Pression, torr	20	1	1-20	20	20
Fraction molaire $\times 10^{-6}$	260	7000	6000-300	1035	1035
Température, °C	400	400	400	500	300
<b>Caractéristiques du dépôt</b>					
Epaisseur, nm	1800	2000	1800	1200	500
Morphologie	colonnaire	compacte	GdC	colonnaire	compacte
<b>Paramètres du Scratch test</b>					
Premiers défauts	3	16	5,8	5	4
Début de delamination	6,3	18	11	6	4,8
Délamination totale	8	20	15	6,5	5,5

Les valeurs de scratch test que nous avons obtenues pour les films de  $\text{TiO}_2/\text{MOCVD}$ , se comparent à celles mesurées pour trois films de phosphate de calcium déposés électrochimiquement par Wang et al. [5] : les premiers défauts sont visibles pour des charges comprises entre 2 et 6 N ; la charge de délamination totale se situe entre 10 et 12 N.

## 4.2. Protection contre la corrosion

### 4.2.1. La corrosion biologique des biomatériaux métalliques

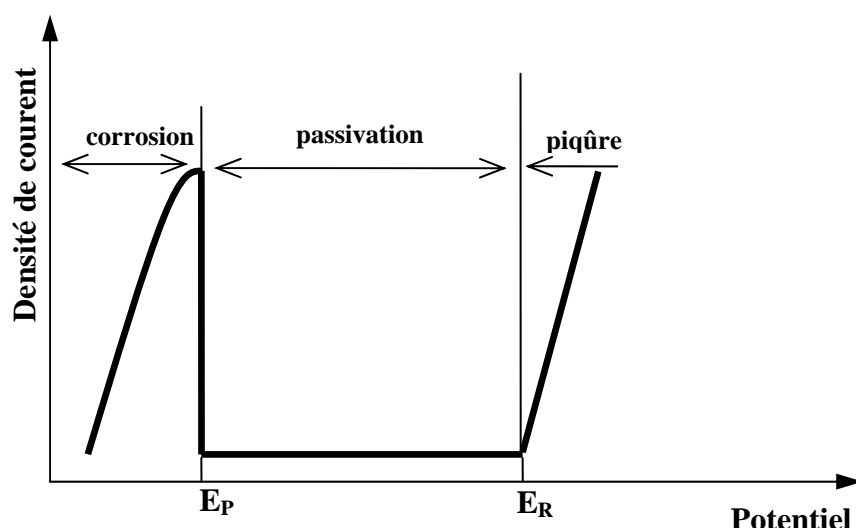
Les biomatériaux doivent être choisis parmi les matériaux résistant le mieux à la corrosion. En effet, une fois en place dans le corps, un implant baigne (chimie) et travaille (mécanique) dans un fluide biologique de composition variable suivant le lieu d'implantation. Il est donc susceptible d'être attaqué par ce fluide. Si elle apparaît, la corrosion devient la cause principale de dégradation et parfois de rupture du matériau. De plus, la concentration en ions libérés par la corrosion peut être élevée et ces ions peuvent avoir des effets toxiques et/ou allergènes. Pour toutes ces raisons, les tests électrochimiques classiques de résistance à la corrosion complètent les tests biologiques *in vitro* et *in vivo* dans l'évaluation de la biocompatibilité d'un matériau.

Plusieurs hypothèses ont été émises sur les mécanismes de bio-corrosion. En milieu aéré, la réaction de réduction de l'oxygène entraîne une augmentation du pH qui favorise la passivation. Par contre, dans les régions anodiques, l'hydrolyse des ions métalliques diminue le pH, ce qui favorise la corrosion. Cette baisse du pH s'ajoute à celle engendrée par les micro-organismes ou par certains métabolismes qui provoquent la formation d'acides organiques (acide lactique par exemple). Des

métaux insuffisamment résistants électrochimiquement ou fissurés à la suite d'une fatigue mécanique sont un lieu de prédilection pour le développement de microorganismes et une attaque anodique par aération différentielle [6]. Il est généralement accepté que l'usure mécanique reste la cause principale de la mauvaise tenue de certains implants métalliques [7] mais l'attaque corrosive joue également [8, 9].

Son potentiel électrochimique standard place le titane parmi les métaux facilement oxydables : il se place au voisinage de l'aluminium, entre le magnésium et le zinc. Ce n'est donc pas un métal noble. Son domaine de stabilité thermodynamique se situe au-dessous du domaine de stabilité thermodynamique de l'eau. Malgré cela, le titane est très résistant à la corrosion. Cette résistance à la corrosion résulte notamment de la formation, en plusieurs étapes, d'une couche de passivation épaisse de quelques nanomètres, constituée majoritairement d'oxyde  $\text{TiO}_2$ . Possédant un potentiel normal ( $E_{\text{Ti}^{4+}/\text{Ti}}^0$ ) très négatif, le titane tend à s'oxyder spontanément à l'air, mais aussi en milieu aqueux du fait de la présence des protons et de l'oxygène dissous. Cette couche d'oxyde, très adhérente, recouvre uniformément la surface. En cas de rayure, l'oxyde se reforme spontanément en présence d'air ou d'eau. Le titane est donc inaltérable dans l'air, l'eau douce et l'eau de mer.

Il n'existe pas de définition pour le terme de *passivité*. Dans la science des biomatériaux, si un implant métallique est oxydé et si cet oxyde est résistant dans des conditions physiologiques, on peut dire que cet implant est passif ou passivé. La couche de passivation du titane est réputée stable sur une large gamme de pH, de potentiel et de température. La figure 4.8 présente le comportement anodique des matériaux susceptibles de se passiver : l'apparition du film de passivation arrête spontanément le processus de corrosion ; cependant, si le film présente de petits défauts ou si la solution contient des ions agressifs, des piqûres peuvent apparaître sur le métal.



**Figure 4.8.** Caractéristiques anodiques d'un matériau passivable (Ti, Al, Fe...)

Une fois l'implant introduit dans l'organisme, des réactions complexes commencent à se produire à l'interface environnement biologique/oxyde. [10] D'une manière générale, pour un métal donné, les conditions *in vivo* peuvent altérer la stabilité du film d'oxyde. Le liquide physiologique peut

hydrolyser la couche d'oxyde. Il peut également contenir des ions agressifs vis à vis des métaux ( $\text{Cl}^-$  ou  $\text{F}^-$ ). Aux altérations dues aux frottements mécaniques viennent s'ajouter les variations locales de pH et/ou de potentiel électrique. Les réponses du titane à ces différentes agressions en font un métal supérieur à beaucoup d'autres métaux, donc adéquat aux applications biologiques.

#### 4.2.2. Etude de la tenue en corrosion du titane recouvert d'oxyde par MOCVD

Nous cherchons à estimer la résistance à la corrosion en milieu SBF (Simulated Body Fluids) des échantillons de titane revêtus de  $\text{TiO}_2$ . Les dépôts d'oxyde préparés diffèrent par leur morphologie de surface, leur rugosité, leur mode de croissance et leur composition allotropique. Deux techniques ont été mise en œuvre : le suivi du potentiel en circuit ouvert et la voltamétrie cyclique.

##### 4.2.2.1. Préparation des échantillons

Le dépôt est présent sur une seule face de l'échantillon. Pour les mesures électrochimiques, seul le dépôt doit être en contact avec la solution. Un fil électrique est donc collé sur la face non revêtue du substrat pour permettre la connexion électrique. Le contact et le substrat sont ensuite bien isolés de la solution à l'aide de téflon.

##### 4.2.2.2. Le choix de la solution

La difficulté majeure des tests électrochimiques *in vitro* est d'utiliser un électrolyte qui reconstitue de manière réaliste le milieu biologique, quels que soient les fluides corporels qui les composent (salive, sang, liquide interstitiel). Si l'on considère le sang humain, rappelons qu'il est constitué de cellules en suspension dans un liquide complexe, le plasma, une solution aqueuse aérée (90% d'eau environ) de substances organiques diverses : glucides, lipides, protéines. Parmi les protéines plasmatiques d'origine hépatique, on trouve l'albumine, la plus importante sur le plan quantitatif, des globulines et du fibrogène (facteur de coagulation). On considère que les acides organiques accélèrent la corrosion [11] et que la présence de protéines peut la ralentir [12].

Les solutions de type SBF (simulated body fluid) sont très fréquemment utilisées pour les tests de corrosion des biomatériaux métalliques [4, 13]. La composition de la solution SBF utilisée est :  $\text{NaCl}$  : 7,934 g/l ;  $\text{NaHCO}_3$  : 0,350 g/l ;  $\text{KCl}$  : 0,222 g/l ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  : 0,174 g/l ;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  : 0,303 g/l ;  $\text{CaCl}_2$  : 0,545 g/l ;  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  : 0,161 g/l. Le pH est égal à 6,5. Elle simule le plasma sanguin dans l'évaluation *in vitro* de la biocompatibilité.

#### 4.2.3. Suivi du potentiel en circuit ouvert (PCO)

Le potentiel d'électrode en circuit ouvert a été enregistré en continu pendant une dizaine de jours, en solution SBF, à la température ambiante. Trois séries d'échantillons recouverts de  $\text{TiO}_2$  par MOCVD ont été soumises à cette mesure.

- une série d'échantillons où les dépôts diffèrent par leur morphologie en section transversale ;

- une série d'échantillons qui diffèrent par la rugosité de la surface avant dépôt (rugosité initiale) ;
- une série d'échantillons préparés à différentes températures de manière que les dépôts présentent des compositions allotropiques différentes.

Pour chaque série, un substrat de Ti poli 4000, puis dégraissé mais non recouvert d'oxyde, a servi de référence (code : Ti).

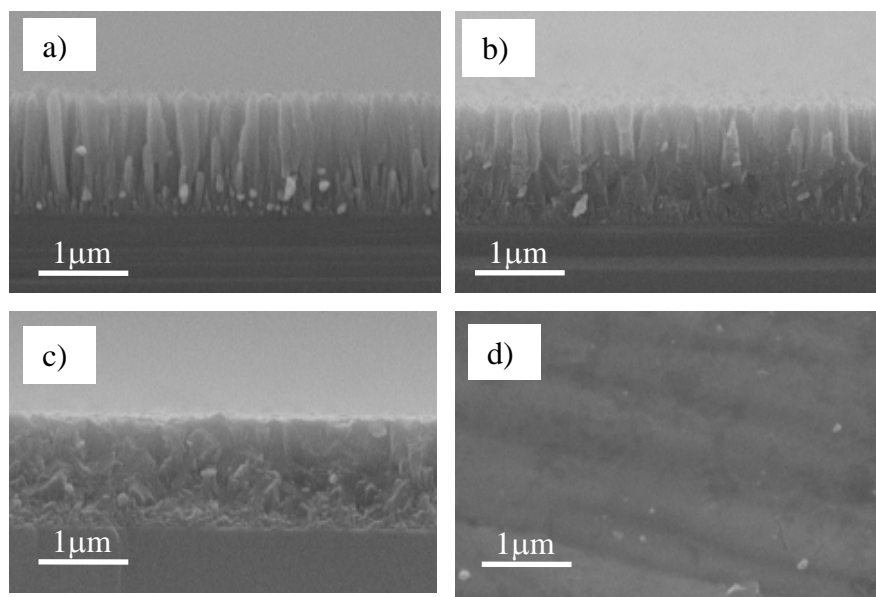
#### 4.2.3.1. Influence de la morphologie en section transversale

Les conditions de préparation de dépôt de  $\text{TiO}_2$  pour cette série d'échantillons sont présentées dans le Tableau 4.2.

**Tableau 4.2** - Paramètres de dépôt pour les échantillons qui diffèrent en morphologie transversale

Echantillon	Poli	P <sub>tot</sub> (torr)	T <sub>dépôt</sub> (°C)	χ <sub>TTIP</sub> (10 <sup>-6</sup> )	Durée (min)	Epaisseur (nm)	morphologie en coupe transverse
TiO <sub>2</sub> /Ti - colonnaire	4000	1	400	2000	90	1400	colonnaire
TiO <sub>2</sub> /Ti - compact		1		7100	50	2000	compact
TiO <sub>2</sub> /Ti - gradient (GdC)		1		6000	35	2000	Gradient (GdC) (compact → colonnaire)
		2		3100	8		
		5		1200	10		
		10		600	20		
		20		300	65		
Ti anodisé	-	-	-	-	50	Dépôt très fin, amorphe	

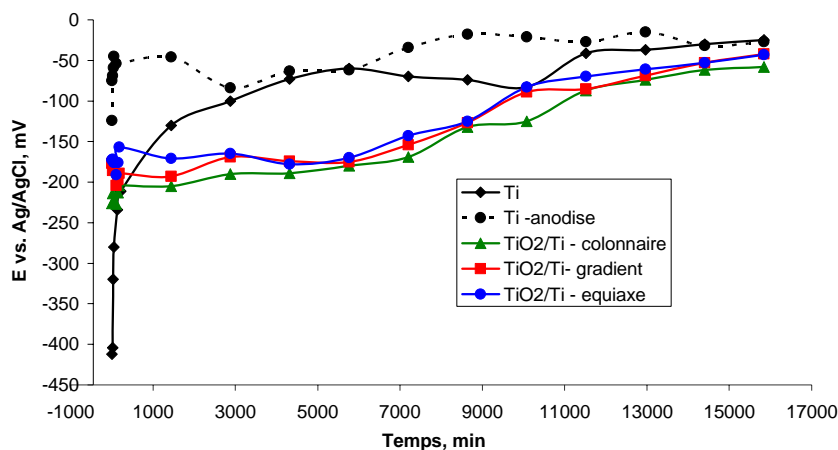
A coté des échantillons recouverts d'oxyde par MOCVD, figure un échantillon de titane anodisé, préparé dans les mêmes conditions que l'échantillon de référence, puis soumis à une oxydation anodique en solution d'acide phosphorique 0,01M. Le dépôt obtenu par anodisation est amorphe. De structure compacte, il est épais de quelques dizaines de nanomètres, donc beaucoup plus fin que les dépôts préparés par MOCVD, comme le montrent les clichés MEB de la Figure 4.9.



**Figure 4.9**

(a-c) Morphologie en section transversale de films de  $\text{TiO}_2$  préparés par MOCVD et de structure :  
a) colonnaire,  
b) GdC,  
c) compacte  
d) Morphologie de surface d'un film de  $\text{TiO}_2$  obtenu par oxydation anodique.

La Figure 4.10 montre la variation du potentiel en fonction du temps pour les échantillons décrits dans le paragraphe précédent. Dès les premières minutes d'immersion, les valeurs les plus négatives sont enregistrées pour le titane non traité. Puis, les larges ondulations du potentiel résultent d'interactions à l'interface dépôt/solution.



**Figure 4.10.** Suivi du potentiel en fonction du temps pour des échantillons qui diffèrent par la morphologie transversale (Tableau 4.2).

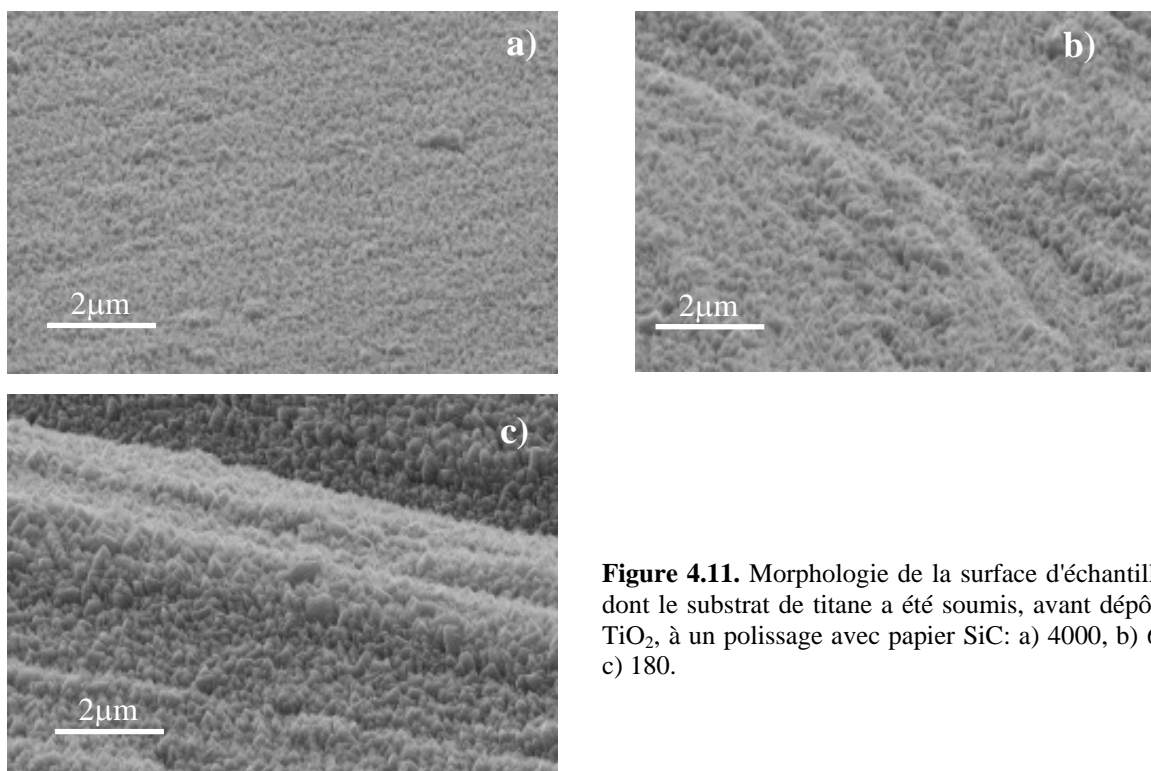
Entre les trois échantillons recouverts de  $\text{TiO}_2$  par MOCVD, il n'existe pas de différences très importantes. L'échantillon recouvert d'un film à structure colonnaire présente cependant des valeurs systématiquement plus négatives que les deux autres échantillons traités par MOCVD. Il est intéressant de noter que ceux-ci, c'est-à-dire les échantillons revêtus d'un dépôt compact et d'un dépôt à gradient de compacité (GdC) présentent souvent des valeurs identiques. L'échantillon naturellement passivé est un peu plus stable que les trois précédents. C'est cependant l'échantillon de titane anodisé qui s'avère être le plus stable des cinq. Au bout de 16000 minutes d'immersion dans la solution SBF, le potentiel semble se stabiliser à -60mV pour la structure colonnaire, -40 mV pour la structure compacte et pour la structure GdC, et -27mV pour l'échantillon de titane anodisé.

#### 4.2.3.2. Influence de la rugosité initiale du substrat de titane

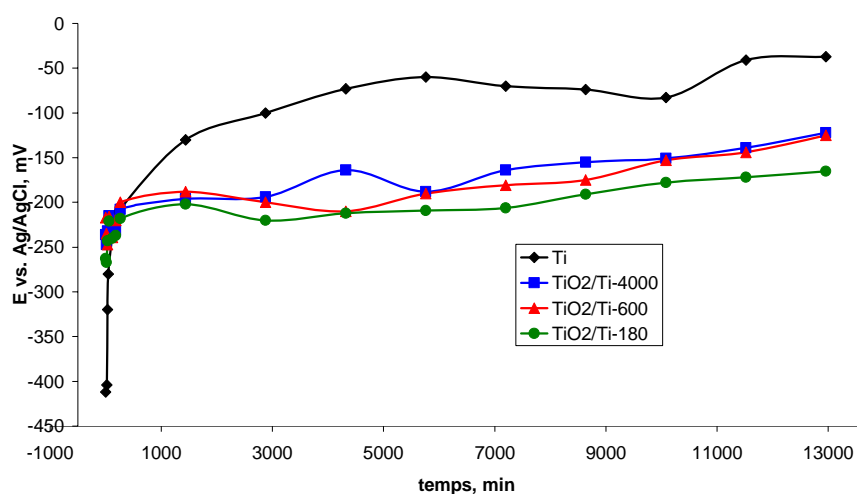
Les conditions de préparation de dépôts différant par la rugosité initiale du substrat et soumis, après revêtement à des mesures de potentiel en circuit ouvert, sont rassemblées dans le Tableau 4.3. La Figure 4.11 montre la topographie de la surface des trois échantillons.

**Tableau 4.3** - Paramètres de préparation de dépôts sur des substrats de rugosités différentes

Code	Poli	$P_{\text{tot}}$ (torr)	$T_{\text{dépôt}}$ (°C)	$\chi_{\text{TIP}}$ ( $10^{-6}$ )	Durée (min.)	Epaisseur (nm)
Ti-4000	<b>4000</b>	20	450	260	120	800
Ti-600	<b>600</b>					
Ti-180	<b>180</b>					



**Figure 4.11.** Morphologie de la surface d'échantillons dont le substrat de titane a été soumis, avant dépôt de  $\text{TiO}_2$ , à un polissage avec papier SiC: a) 4000, b) 600, c) 180.



**Figure 4.12** - Suivi du potentiel en fonction du temps pour des échantillons différant par la rugosité du substrat (Tableau 4.3).

La Figure 4.12 montre que la rugosité initiale du substrat n'a pas une influence marquante sur l'évolution du potentiel d'électrode avec le temps. Cependant, les valeurs de potentiel les plus électronégatives correspondent au substrat initialement le plus rugueux. Ces valeurs se stabilisent vers -165 mV. Pour les deux autres échantillons recouverts de  $\text{TiO}_2$ , le potentiel monte jusque vers -120 mV. Pour le titane non traité il atteint -37 mV.

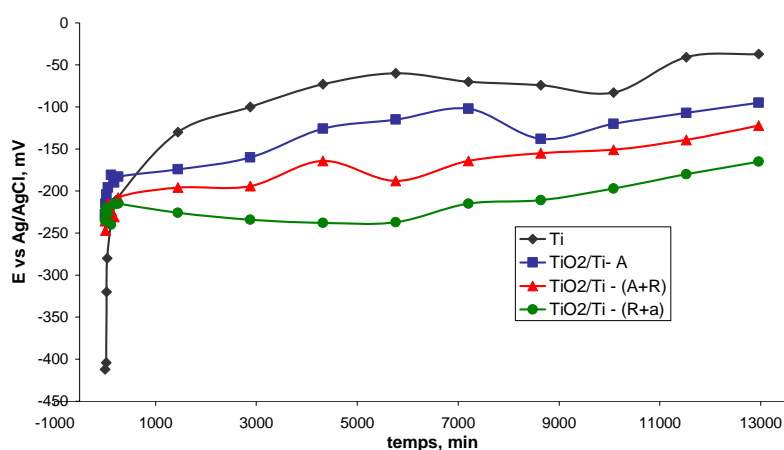
#### 4.2.3.3. Influence de la composition allotropique

Les conditions de préparation de trois dépôts de compositions allotropiques différentes sont rassemblées dans le Tableau 4.4. Les différences de composition allotropique sont obtenues en variant la température de dépôt : la teneur en rutile augmente avec la température. On remarque cependant que les échantillons diffèrent également par leur épaisseur.

**Tableau 4.4** - Paramètres de dépôt pour des échantillons de compositions allotropiques différentes.

Code	Poli	P <sub>tot</sub> (torr)	T <sub>dépôt</sub> (°C)	$\chi_{\text{TIP}}$ (10 <sup>-6</sup> )	Durée (min.)	Epaisseur (nm)	Composition allotropique
T21	4000	20	350	260	180	<b>1000</b>	<b>anatase uniquement</b>
T22			450	260	120	<b>800</b>	<b>anatase + rutile (~ 50/50)</b>
T23			600	76	180	<b>600</b>	<b>rutile majoritaire anatase minoritaire</b>

L'évolution du potentiel en circuit ouvert pour ces trois échantillons (Figure 4.13) montre des différences plus importantes que sur les deux diagrammes précédents. Très logiquement, la stabilité augmente avec l'épaisseur. On peut cependant se demander si l'appauvrissement en anatase et l'enrichissement consécutif en rutile qui accompagnent l'augmentation d'épaisseur dans les échantillons testés ne jouent pas également un rôle. On peut simplement remarquer que l'anatase ayant une structure cristalline légèrement moins dense que le rutile, le passage d'une composition riche en anatase à une composition riche en rutile (donc moins poreuse) devrait s'accompagner d'une augmentation du potentiel. Or c'est l'inverse qui est observé. Donc, si la composition allotropique a une influence, celle-ci est mineure devant l'influence de l'épaisseur.



**Figure 4.13** - Suivi du potentiel en fonction du temps pour des échantillons présentant des épaisseurs différentes (Tableau 4.4).

#### 4.2.3.4. Commentaires sur les trois séries de mesures du PCO

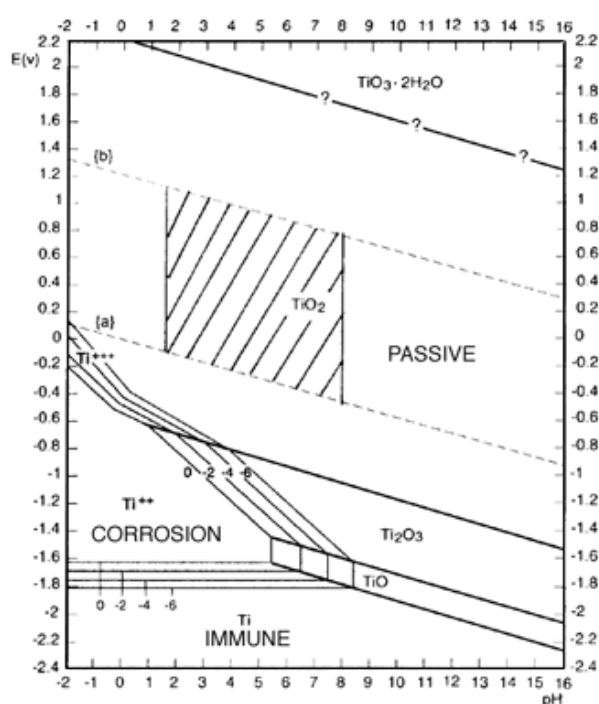
Dans les trois séries d'échantillons, on observe que la première valeur enregistrée pour le titane non traité par MOCVD est considérablement plus négative que pour les échantillons recouverts



du film d'oxyde par MOCVD. L'augmentation rapide du potentiel dénote la formation d'oxyde de passivation.

Au cours du temps, le potentiel subit des variations plus ou moins prononcées à la suite d'interactions entre les ions de la solution et la surface à travers la couche d'oxyde. Après quelques jours, par rapport au titane passivé naturellement, les échantillons traités par MOCVD présentent des valeurs du potentiel légèrement plus négatives et plus stables au cours du temps dans la solution SBF.

Toutes les valeurs de potentiel d'électrode enregistrées en circuit ouvert, se situent dans le domaine de passivation du titane, comme le montre le diagramme de Pourbaix du titane (Figure 4.14) [14]. Ces valeurs sont comprises entre -0,4V et -0,03 V. On observe que le potentiel augmente avec le temps. Le film de  $\text{TiO}_2$  n'est donc pas soumis à des processus de dissolution.



**Figure 4.14.** - Diagramme Pourbaix du système Ti – H<sub>2</sub>O. La région hachurée correspond aux conditions de l'environnement biologique.

Ce diagramme de Pourbaix montre que le Ti est réactif thermodynamiquement mais qu'il résiste à la corrosion grâce au film passif stable qui se forme à sa surface et qu'il est stable sur toute la gamme de pH.

#### 4.2.4. Voltamétrie cyclique

Les principaux paramètres électrochimiques: le potentiel de corrosion ( $E_{\text{cor}}$ ), la densité de courant de corrosion ( $i_{\text{cor}}$ ) et la résistance de polarisation ( $R_p$ ) ont été déterminés par voltamétrie cyclique.

Il est très important de choisir des limites raisonnables pour le balayage en potentiel. Si le potentiel de départ est trop négatif, il se produit un dégagement d'hydrogène, correspondant à la

réduction de l'eau. Au contraire, pour un potentiel supérieur à 3,5 V, il se produit un dégagement d'oxygène, correspondant à l'oxydation de l'eau. Donc l'intervalle de balayage du potentiel retenu va de -0,8 à 3,5V. Comme pour le potentiel en circuit ouvert, les courbes de voltamétrie cyclique ont été enregistrées dans une solution SBF.

Une courbe typique de polarisation comprend une partie active, une partie passive et une partie trans-passive. Dans le cas du titane la partie active, qui correspond à la dissolution du métal, n'existe pas grâce à la couche de  $\text{TiO}_2$  de passivation ou déposée.

La littérature contient de nombreuses informations sur le comportement électrochimique du titane, traité ou non, dans des solutions variées (voir le Tableau en annexe) Pour le moment, il n'existe pas d'étude sur la caractérisation électrochimique des films d'oxyde de titane obtenu par MOCVD.

Tous les échantillons étudiés présentent un domaine de passivation très large et des densités de courant très faibles : on ne peut donc pas parler d'un processus de corrosion sur ces échantillons.

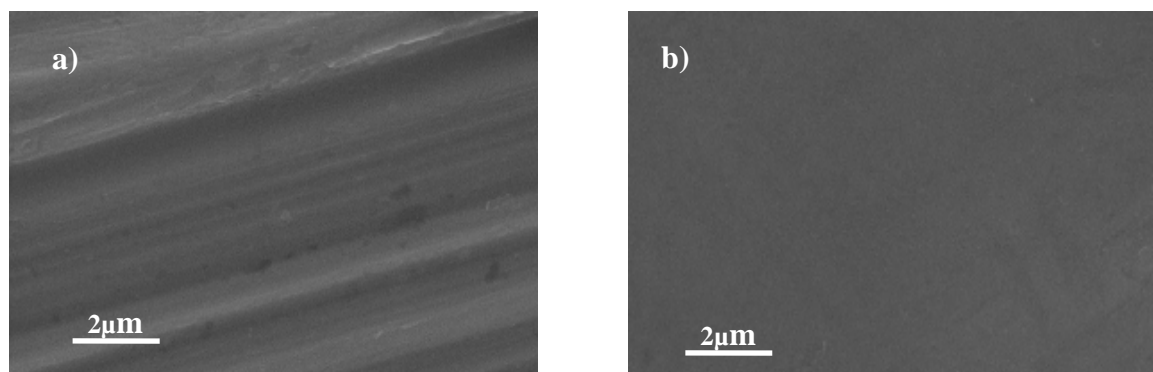
Pour évaluer le comportement électrochimique en milieu SBF, on a comparé le substrat de Ti de référence aux substrats recouverts de dépôts de  $\text{TiO}_2$ , obtenus dans différentes conditions (Tableaux 4.5 – 4.7). Il faudra vérifier si les paramètres de corrosion obtenus avec ces dépôts se situent dans le domaine de valeurs généralement acceptées pour une utilisation biomédicale.

#### 4.2.4.1. Comportement du substrat nu en fonction de sa rugosité

Cette étude a commencé par la mesure de la résistance à la corrosion du substrat de titane non traité, en fonction de sa rugosité. Le Tableau 4.5 donne les quatre valeurs de rugosité obtenues en fonction des papiers utilisés pour le polissage (Figure 4.15).

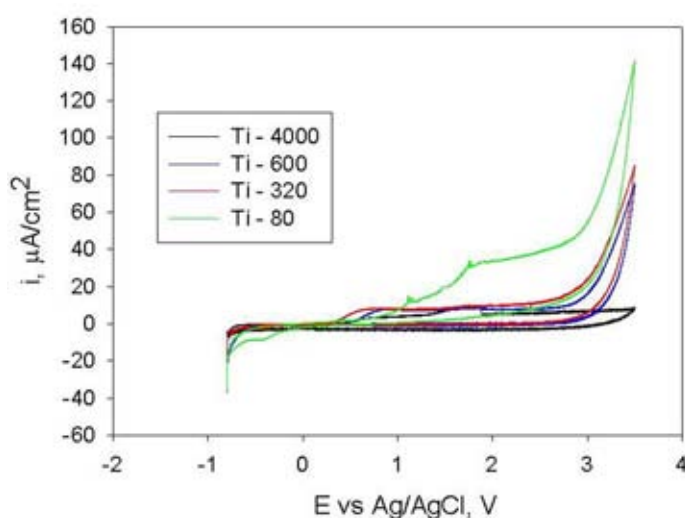
**Tableau 4.5** - Relation entre granulométrie du papier, taille moyenne des grains de SiC et rugosité du substrat

Granulométrie du papier	80	180	1000	4000
Grosseur moyenne des grains ( $\mu\text{m}$ )	200	76	18	5
Rugosité $R_a$ ( $\mu\text{m}$ )	1,50	0,85	0,25	0,04



**Figure 4.15.** Morphologie de surface pour le substrat de Ti soumis à polissage avec papier SiC a) 80 ; b) 4000

La Figure 4.16 présente les voltamogrammes cycliques obtenus avec ces quatre rugosités, et montre que la rugosité a une influence significative sur le comportement du titane dans une solution d'électrolyte. On observe, sur les quatre échantillons, un phénomène d'auto-passivation par formation d'une couche d'oxyde dans les premières secondes de l'immersion. Dès que le potentiel augmente, la surface recouverte par l'oxyde de passivation devient plus stable. La courbe de polarisation anodique permet d'apprécier l'étendue du domaine de passivation. Cette étendue diminue quand la rugosité augmente, passant de 2380 mV pour la surface la plus lisse à 1250 mV pour la surface la plus rugueuse. La Figure 4.16 montre également que les valeurs les plus élevées de la densité de courant apparaissent en fin de polarisation anodique pour les échantillons les plus rugueux. Aparicio et al [15] ont interprété ce comportement. L'augmentation de rugosité provoque une augmentation de la surface réelle en contact avec la solution et donc une augmentation de l'ampérage qui traverse l'échantillon. Comme la surface apparente de l'échantillon reste constante, la densité de courant par unité de surface apparente augmente également. Au voisinage de 2500 mV, la densité de courant se met à augmenter très rapidement mais ce phénomène est lié à la dissociation de l'eau. Les paramètres électrochimiques sont présentés à la fin de l'étude (Tableau 4.8).



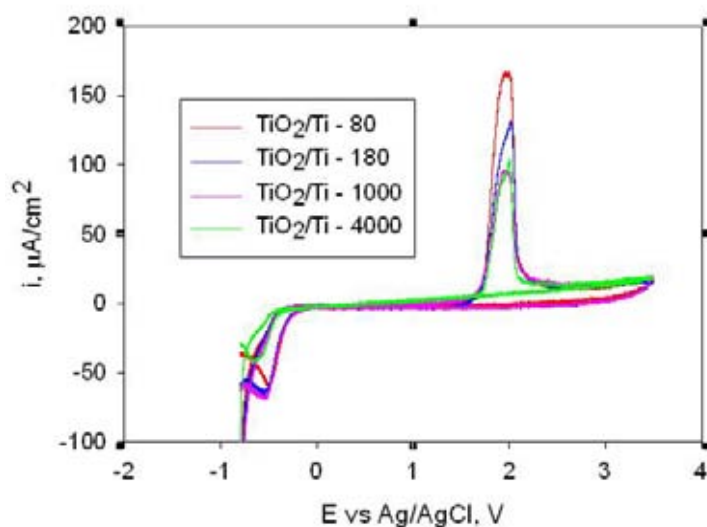
**Figure 4.16** - Voltamétrie cyclique pour quatre substrats de titane non traités, et de rugosités différentes.

#### 4.2.4.2. Etude de dépôts sur des substrats de rugosités différentes

Examinons maintenant les résultats concernant des échantillons recouverts d'oxyde de titane par MOCVD, en commençant par quatre échantillons qui ne diffèrent que par la rugosité du substrat. Les conditions de préparation de ces échantillons sont résumées dans le Tableau 4.6.

**Tableau 4.6** - Les paramètres de dépôt pour les échantillons qui diffèrent par la rugosité initiale du substrat

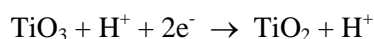
Code	Poli	$P_{\text{tot}}$ (torr)	$T_{\text{dépôt}}$ (°C)	$\chi_{\text{TIP}}$ ( $10^{-6}$ )	Durée (min.)	Épaisseur (nm)
Ti-80	80	20	400	1035	45	~ 1200
Ti-180	180					
Ti-1000	1000					
Ti-4000	4000					



**Figure 4.17.** Voltamétrie cyclique pour quatre dépôts sur des substrats de titane de rugosités différentes (Tableau 4.6).

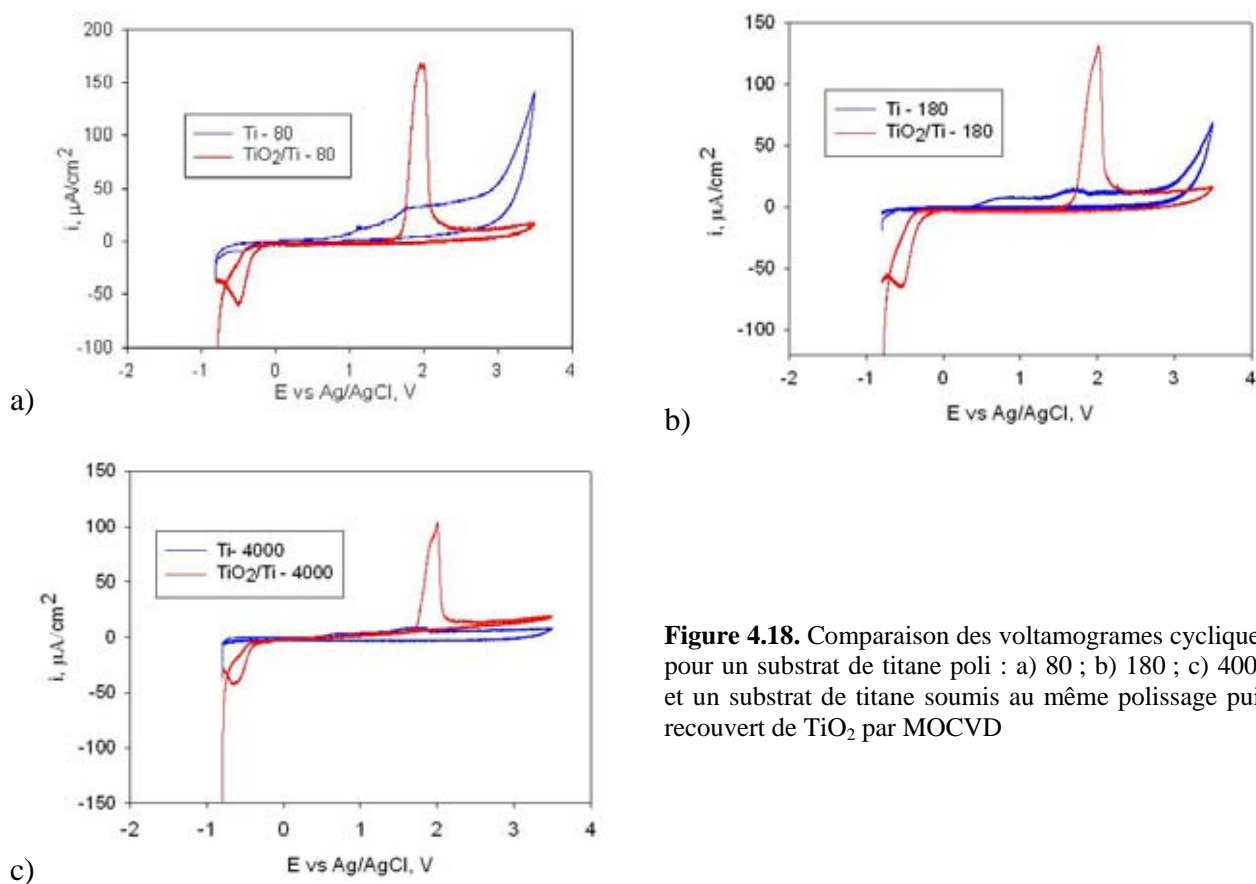
Les voltamogrammes sont présentés sur la Figure 4.17. Un premier domaine de passivation s'étend de -0,15 V environ à 1,6 V, avec des valeurs de densité de courant de passivation très faibles. A partir de 1,7 V, la densité de courant augmente rapidement et un pic anodique apparaît autour de 2 V, d'autant plus élevé que la rugosité du substrat est importante. Un second domaine de passivation s'étend de 2,2 V à 3,5 V et la densité de courant augmente doucement à cause de la dissociation de l'eau. L'augmentation très forte du courant dans le pic à 2V est aussi liée à une augmentation de la surface spécifique à cause de la différence de polissage (des surfaces de plus en plus rugueuses).

Pendant le balayage du potentiel vers les valeurs négatives, un pic cathodique apparaît à des potentiels situés entre -0,60 et -0,47 V, en fonction de la rugosité. Ce type de comportement a été observé par Peláez-Abellán [16] pour le titane immergé dans une solution physiologique simulée (pH = 7). Le pic a été associé à la réduction d'un oxyde-peroxyde instable,  $\text{TiO}_3$ . Ce composé pourrait résulter de l'oxydation anodique pour des potentiels supérieurs à 3V. Le pic cathodique est d'autant mieux formé que la rugosité est forte et on peut l'observer aussi dans le voltamogrammes des substrats de Ti nus.



La Figure 4.18 permet de comparer, pour trois polissages différents, un substrat de Ti poli mais non traité et un substrat de Ti poli de la même façon puis recouvert de  $\text{TiO}_2$ . La plus grande différence entre les courbes consiste dans l'apparition du pic à 2V. On constate également que le domaine de passivation est plus large pour les échantillons traités par MOCVD. C'est difficile de trouver exactement l'origine du pic lorsqu'on a pas mal de caractérisations électrochimiques sur ce type de films qui ont une structure particulière. Les échantillons traités par MOCVD présentent

également une différence de densité de courant entre la courbe anodique et la courbe cathodique ; plus cette différence est petite, plus le film est résistant et stable dans le milieu étudié.



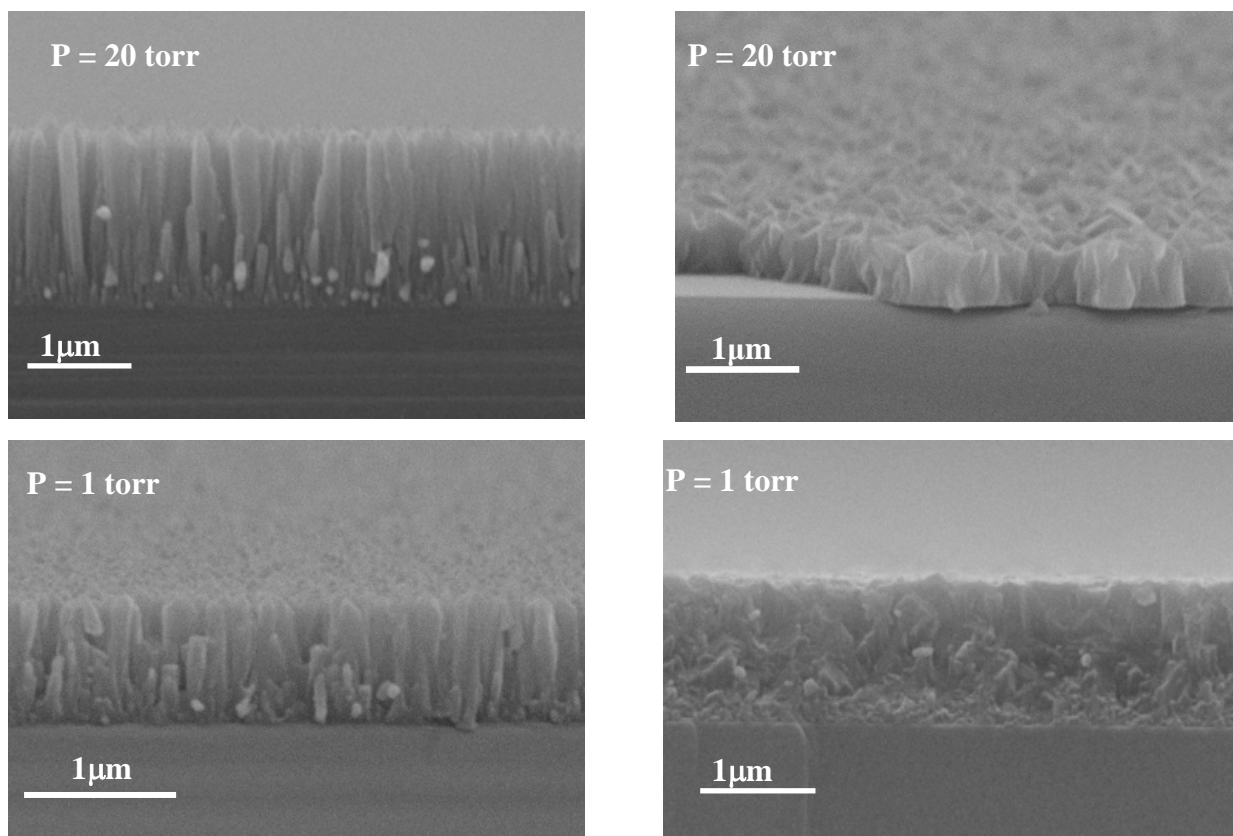
**Figure 4.18.** Comparaison des voltamogrammes cycliques pour un substrat de titane poli : a) 80 ; b) 180 ; c) 4000 et un substrat de titane soumis au même polissage puis recouvert de  $\text{TiO}_2$  par MOCVD

#### 4.2.4.3. Influence de la morphologie transverse du dépôt

Des dépôts différant par leur morphologie transverse ont été préparés à 1 torr et à 20 torr, sur des substrats polis 4000 (Tableau 4.7). Les deux modes de croissance – colonnaire et compact – sont mis en évidence par les clichés MEB, de la Figure 4.19.

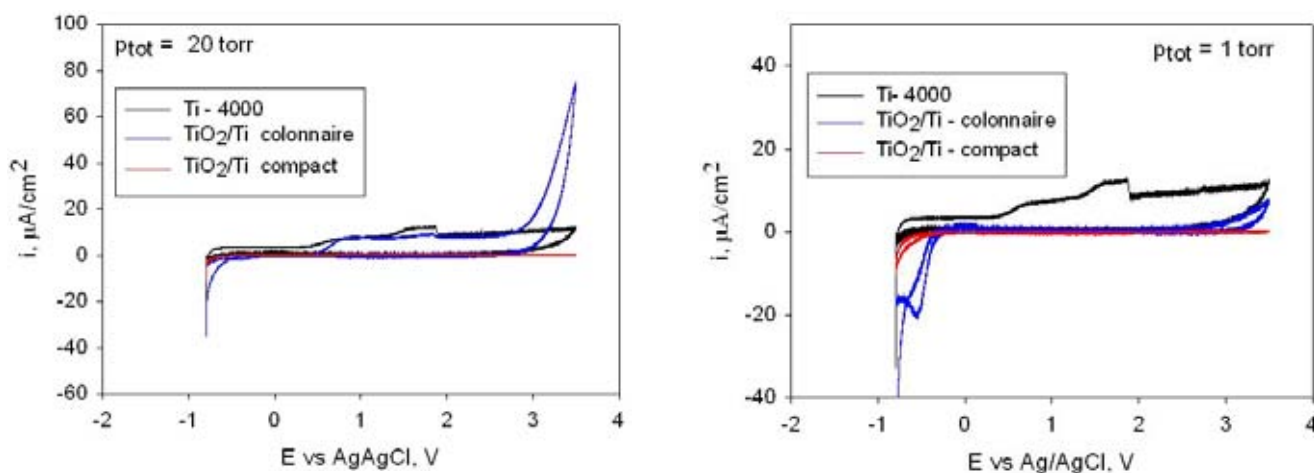
**Tableau 4.7** - Paramètres de dépôt pour les échantillons de morphologies transverses différentes

Code	$P_{\text{tot}}$ (torr)	$T_{\text{dépôt}}$ (°C)	$Q_{\text{vec}}$ (sccm)	$Q_{\text{dil}}$ sccm	$\chi_{\text{TTIP}}$ ( $10^{-6}$ )	Durée (min)	$T_{\text{prec}}$ (°C)	Épaisseur (nm)
$\text{TiO}_2/\text{Ti}$ - colonnaire	1	400	25	575	2000	90	26	1500
$\text{TiO}_2/\text{Ti}$ - compact								800
$\text{TiO}_2/\text{Ti}$ - colonnaire	20	400	20	575	260	200	41	1600
$\text{TiO}_2/\text{Ti}$ - compact								1800



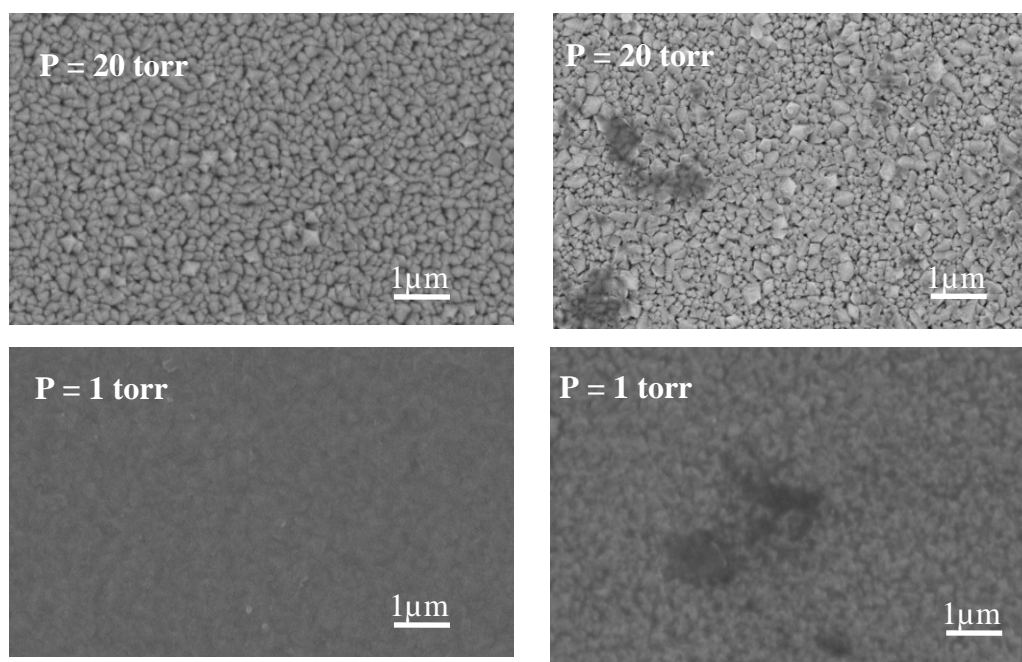
**Figure 4.19.** Morphologie en section transverse de films de TiO<sub>2</sub> déposés à 20 torr (haut) et 1 torr (bas)

Les courbes de voltamétrie cyclique pour ces différentes morphologies sont présentées sur la Figure 4.20. Il est intéressant de constater que les films de structure compacte se comportent comme une barrière. Aucune réaction ne se passe à la surface, ni d'oxydation, ni de réduction. La densité de courant reste constante, à des valeurs très faibles, pendant les parcours anodique et cathodique. La courbe cathodique et la courbe anodique sont superposées, une autre preuve de la stabilité. Des deux structures colonnaires, c'est le film d'oxyde déposé à 1 torr qui présente la meilleure résistance.



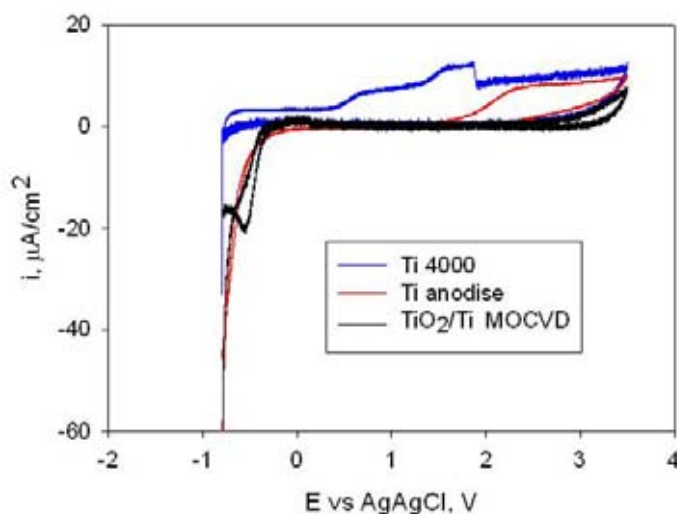
**Figure 4.20.** Comparaison entre les voltamogrammes cycliques pour les dépôts par MOCVD de TiO<sub>2</sub> colonnaire ou compact sur substrat de titane poli 4000 (à gauche, dépôt sous 20 torr ; à droite dépôt sous 1 torr)





**Figure 4.21.** Morphologie de surface (clichées MEB) avant (à gauche) et après (à droite) le test de corrosion pour le dépôt de structure colonnaire déposé à 20 torr (en haut) et le dépôt de structure compacte, déposé à 1 torr (en bas).

Après les tests de résistance à la corrosion, des surfaces d'oxyde ayant été en contact avec la solution ont été observées au microscope électronique afin d'en vérifier l'intégrité : des fissures ou d'autres types d'endommagement sont-ils apparus ? Les clichés MEB sont montrés dans la Figure 4.21, pour deux échantillons présentant des morphologies de surface différentes. Ces micrographies ne révèlent la présence d'aucun défaut sur les surfaces testées électrochimiquement, à l'exception des quelques traces noires provenant probablement de la solution, mais qui ne remettent pas en cause la qualité des films.



**Figure 4.22.** - Voltamogrammes cycliques pour :  
 - un substrat de titane nu poli 400 (bleu)  
 - un substrat de titane anodisé (rouge)  
 - un substrat de titane recouvert de  $\text{TiO}_2$  par MOCVD (noir).

La Figure 4.22 présente une comparaison entre le substrat de titane non traité, et deux échantillons recouverts, l'un d'une couche d'oxyde de quelques nanomètres d'épaisseur déposée par électrochimie, l'autre d'une couche d'oxyde plus épaisse déposée par MOCVD sous  $P = 1$  torr, avec  $\chi = 2000 \times 10^{-6}$ . L'oxyde d'anodisation montre lui aussi une bonne stabilité dans la solution aqueuse.

#### 4.2.4.4. Discussion générale sur les résultats des tests électrochimiques

Les paramètres électrochimiques déduits des courbes de voltamétrie cycliques sont rassemblés dans le Tableau 4.8. De cette étude du comportement électrochimique du couple (substrat Ti)/(TiO<sub>2</sub> déposé par MOCVD) en milieu SBF, on peut tirer les conclusions suivantes :

1. Toutes les valeurs de potentiel d'électrode enregistrées en circuit ouvert, se situent dans le domaine de passivation du titane et sont comprises entre -0,4V et -0,03 V. On observe que le potentiel augmente avec le temps. Les films de TiO<sub>2</sub> ne sont donc pas soumis à des processus de dissolution.

2. Des courbes de voltamétrie cyclique, on peut conclure :

- les paramètres électrochimiques calculés pour le titane non revêtu sont en accord avec les valeurs trouvées dans la littérature pour les domaines de passivation, les courants de corrosion, la résistance à la polarisation, le domaine de passivité [11, 17] ;
- les échantillons de titane soumis seulement à un polissage présentent une auto-passivation dès les premiers instants d'immersion dans la solution d'électrolyte ;
- les valeurs de la densité de courant pour tous les échantillons revêtus avec du TiO<sub>2</sub> par les deux méthodes (MOCVD et anodisation) sont très faibles, ce qui indique que les films sont stables et compacts ;
- la présence du dépôt de TiO<sub>2</sub> conduit à une augmentation des valeurs du potentiel de corrosion vers des valeurs plus électropositives si on compare aux valeurs de  $E_{cor}$  des substrats de titane non revêtus : la résistance à la corrosion est donc bien améliorée ;
- le domaine de passivation est plus large pour le titane traité par MOCVD que pour le titane non traité ; les domaines de passivation s'étendent même, dans le cas des échantillons recouverts par le TiO<sub>2</sub> par MOCVD, sur plus de 2500 mV ;
- il n'existe pas le phénomène de *breakdown* pour les films de TiO<sub>2</sub> déposés sur la surface de titane ;
- les films de TiO<sub>2</sub> obtenus par MOCVD, plus particulièrement les films obtenus à 1 torr, ne présentent aucune réactivité jusqu'à 1,7 V. Si on considère que le potentiel dans les fluides biologiques peut atteindre au maximum 1V, on peut dire que ce comportement les rend adéquats à une utilisation médicale ;
- les courbes *retour*, avec des valeurs négatives de densité de courant, montrent l'absence de corrosion locale ;



- d'après les valeurs maximales de la densité de courant en fin de courbe anodique, les couches d'oxyde les moins stables sont la couche d'oxyde natif sur l'échantillon Ti-80 ( $i_{fin} = 140 \mu A/cm^2$ ) et le substrat recouvert par MOCVD d'une couche d'oxyde à structure colonnaire ( $i_{fin} = 75 \mu A/cm^2$ ) ;
- la rugosité initiale du substrat affecte, mais dans une mesure limitée, les paramètres électrochimiques : des quatre échantillons choisis pour étudier l'influence de la rugosité du substrat, c'est celui dont la surface de substrat est la plus lisse (TiO<sub>2</sub>/Ti4000) qui témoigne de la meilleure résistance à la corrosion.

En solution SBF, par rapport à la seule couche d'oxyde natif, la couche d'oxyde déposée par MOCVD améliore la stabilité, le domaine de passivation, le potentiel et le courant de corrosion et la résistance de polarisation du titane. Les valeurs de  $R_p$  plus élevées et les valeurs de  $i_{cor}$  plus faibles indiquent des surfaces mieux protégées contre la corrosion. Soulignons que les meilleurs résultats sont observés pour les dépôts préparés à 1 torr. Le film d'oxyde, par sa compacité, se comporte comme un semi-isolant électrique pour la surface, comme le montre l'horizontalité de la courbe de voltamétrie cyclique.

**Tableau 4.8.** Paramètres de corrosion pour les échantillons analysés par voltamétrie cyclique. (a) indique que les paramètres n'ont pas pu être calculés à cause de l'allure horizontale des courbes cycliques

Echantillon	Domaine de passivation, mV		Potentiel de corrosion,  E <sub>cor</sub> , mV	Courant de corrosion,  i <sub>cor</sub> , nA/cm <sup>2</sup>	Résistance de polarisation  R <sub>p</sub> , MΩ
Substrat de titane non traité					
Ti - 80	1250		-66	20,80	1,25
Ti-180	1600		-15	10,41	2,50
Ti -1000	1950		347	9,62	2,70
Ti - 4000	2380		198	8,33	3,12
Dépôt MOCVD de TiO <sub>2</sub> sur des substrats titane de rugosités différentes					
TiO <sub>2</sub> /Ti - 80	1920	Repassivation après 2200mV  → 3300mV	1428	6,77	3,84
TiO <sub>2</sub> /Ti - 180	1950		1546	5,72	4,54
TiO <sub>2</sub> /Ti - 1000	1970		1199	4,42	5,88
TiO <sub>2</sub> /Ti - 4000	2050		631	4,42	5,88
Dépôt MOCVD de TiO <sub>2</sub> sous 1 torr					
TiO <sub>2</sub> /Ti - colonnaire	3300		650	5,5	4,8
TiO <sub>2</sub> /Ti – compact	plus de 3500		(a)	(a)	(a)
Dépôt MOCVD de TiO <sub>2</sub> sous 20 torr					
TiO <sub>2</sub> /Ti – colonnaire	2500		142	5,99	4,34
TiO <sub>2</sub> /Ti – compact	plus de 3500		(a)	(a)	(a)
Ti – anodisé	2150		592	5.46	4.76

## Références

1. C. Julia-Schmutz, H.E. Hintermann, *Microscratch testing to characterize the adhesion of thin layers*. Surf Coat Technol, 1991. 48: p. 1-6.
2. S. J. Bull, *Failure mode maps in the thin film scratch adhesion test*. Tribol. Int., 1997. 30 p. 491-498.
3. C. Chen, Q. Dong, H. Yu, X. Wang, D. Wang, *Microstructure of Porous TiO<sub>2</sub> Coating on Pure Ti by Micro-arc Oxidation*. Advanced Engineering Materials, 2006. 8(8): p. 754-759.
4. L. Zhu, X. Ye, G. Tang, N. Zhao, Y. Gong, Y. Zhao, J. Zhao, X. Zhang, *Corrosion test, cell behavior test, and in vivo study of gradient TiO<sub>2</sub> layers produced by compound electrochemical oxidation*. J Biomed Mater Res 2006. 78A: p. 515-522.
5. J. Wang, P. Layrolle, M. Stigter, K. de Groot, *Biomimetic and electrolytic calcium phosphate coatings on titanium alloy: physicochemical characteristics and cell attachment*. Biomaterials 2004. 25: p. 583-592.
6. B. Anandkumar, S. Maruthamuthu, *Molecular identification and corrosion behaviour of manganese oxidizers on orthodontic wires*. Current Science CURRENT SCIENCE, VOL. , NO. 7, 10 APRIL 2008, 2008. 94: p. 891-896.
7. M. Sivakumar, U. Kamachi Mudali, S. Rajeswari, *Investigation of fatigue failure of a stainless steel orthopedic implant device*. Journal of Materials Engineering and Performance, 1994. 3: p. 111-113.
8. D. Hansen, *Metal Corrosion in the Human Body: The Ultimate Bio-Corrosion Scenario* Electrochemical Society Interface, 2008 Summer: p. 31- 34.
9. M.A. Khan, R.L. Williams, D.F. Williams, *In-vitro corrosion and wear of titanium alloys in the biological environment*. Biomaterials, 1996. 17: p. 2117-2126.
10. M. Textor, C. Sittig, V. Frauchiger, S. Tosatti, D.M. Brunette, *Properties and Biological Significance of Natural Oxide Films on Titanium and Its Alloys*. In: Brunette PM, Tengvall P, Textor M, Thomsen P, editors. Titanium in medicine: material science, surface science, biological responses and medical applications. Heidelberg, Berlin: Springer, 2001: p. 172-230.
11. Z. Cai, H. Nakajima, M. Woldu, A. Berglund, M. Bergman, T. Okabe, *In vitro corrosion resistance of titanium made using different fabrication methods*. Biomaterials 1999. 20: p. 183-190.
12. H.H. Huang, *Effect of fluoride and albumin concentration on the corrosion behavior of Ti-6Al-4V alloy*. Biomaterials, 2003. 24: p. 275-282.
13. M.C. Advincula, D. Petersen, F. Rahemtulla, R. Advincula, J.E. Lemons, *Surface Analysis and Biocorrosion Properties of Nanostructured Surface Sol-Gel Coatings on Ti6Al4V Titanium Alloy Implants*. J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater, 2007. 80B: p. 107-120.
14. M. Pourbaix, *Atlas of Electrochemical Equilibria in Aqueous Solutions*. 1974, Houston: NACE. 644.
15. C. Aparicio, F.J. Gila, C. Fonseca, M. Barbosa, J.A. Planell, *Corrosion behaviour of commercially pure titanium shot blasted with different materials and sizes of shot particles for dental implant applications*. Biomaterials, 2003. 24: p. 263-273.
16. E. Pelaez-Abellan, L. Rocha-Sousa, W.D. Muller, and A.C. Guastaldi, *Electrochemical stability of anodic titanium oxide films grown at potentials higher than 3 V in a simulated physiological solution*. Corrosion Science 2007. 49: p. 1645-1655.
17. C. Kuphasuk, Y. Oshida, C. J. Andres, S. T. Hovijitra, M. T. Barco, D. T. Brown, *Electrochemical corrosion of titanium and titanium-based alloys*. J Prosthet Dent, 2001. 85: p. 195-202.



## Chapitre V

### Evaluation de la biocompatibilité des dépôts de TiO<sub>2</sub>

## Chapitre V – Evaluation de la biocompatibilité des dépôts de TiO<sub>2</sub>

La performance des dispositifs médicaux implantables dépend de la réponse des tissus concernés en présence du matériau implanté. Il est donc nécessaire d'étudier le comportement cellulaire au contact d'un matériau non-vivant. La connaissance de ces interactions permet de comprendre les problèmes biologiques fondamentaux et aide à concevoir les dispositifs médicaux implantables. L'ingénierie tissulaire, un domaine nouveau, est un exemple d'activité où la connaissance et la maîtrise de ces interactions sont vitales pour la création des tissus fonctionnels.

Le nombre de cellules qui adhèrent sur un substrat est un indicateur fort de la qualité du comportement des cellules sur ce substrat. On distingue l'adhérence cellule – cellule et l'adhérence cellule – substrat. Dans l'adhérence cellule – substrat, les cellules s'attachent aux protéines de la matrice extra cellulaire (MEC) adsorbées sur la surface du substrat. Les cellules adhérentes (les fibroblastes et les ostéoblastes) exigent la formation de tels points d'adhérence pour survivre.

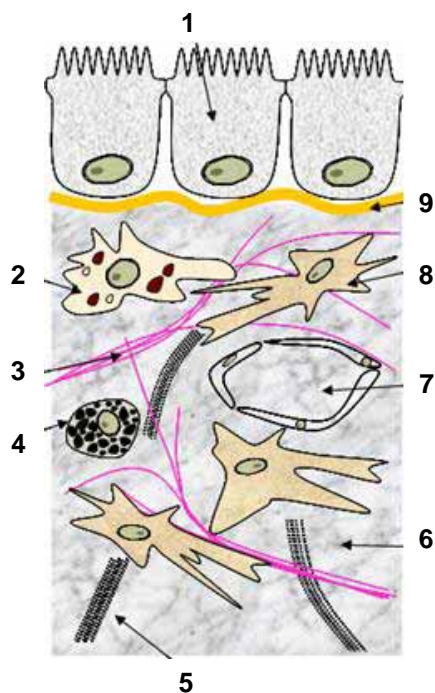
Plusieurs publications récentes décrivent l'influence des caractéristiques de surface d'un implant sur le comportement de divers types cellulaires : fibroblastes [1], ostéoblastes [2], cellules épithéliales [3], macrophages [4], etc.

### 5.1. Généralités sur les fibroblastes et les ostéoblastes

Avant de présenter les résultats des études *in vitro*, nous présentons quelques généralités sur ces deux types de cellules : les fibroblastes et les ostéoblastes.

#### 5.1.1. Fibroblastes

Les tissus conjonctifs fibreux sont des tissus de soutien composés d'un nombre réduit de cellules (fibroblastes et mastocytes) et de fibres (collagène, élastine), et d'une grande quantité de substance extracellulaire (substance basale de la MEC). Les tissus conjonctifs sont séparés des cellules épithéliales par la couche basale (Figure 5.1).



**Figure 5.1.** Schéma d'un tissu conjonctif :

- 1 – cellule épithéliale
- 2 - macrophages
- 3 - fibres élastiques
- 4 - mastocyte
- 5 - fibres de collagène
- 6 - glycosaminoglycannes
- 7 - capillaire
- 8 - fibroblaste
- 9 - couche basale

**Les fibroblastes (FB)** ont un rôle essentiel dans le développement de l'organisme. Leur fonction principale est de maintenir l'intégrité structurale des tissus conjonctifs par la sécrétion continue des précurseurs de la matrice extracellulaire. Ce sont donc des cellules au métabolisme intense. Ce type de cellules présente des terminaisons cytoplasmiques qui leur permettent de se déplacer et de se reconnaître entre elles. Par rapport à d'autres types cellulaires, les FB en culture ont la capacité de maintenir leur morphologie. Une des caractéristiques des cultures de FB normaux est la formation d'une structure monocouche grâce à l'inhibition de contact. La morphologie des FB peut varier en fonction de la nature du substrat sur lequel elles adhèrent et de la surface disponible pour leur déplacement et leur division.

Les FB se présentent sous deux formes, avec des particularités morpho-fonctionnelles distinctes : les fibroblastes actifs (impliqués dans des processus métaboliques spécifiques) et les fibroblastes inactifs, nommés fibrocytes (des FB en repos fonctionnel). Les FB sont impliqués dans la cicatrisation des lésions tissulaires : les endommagements du tissu stimulent les fibrocytes et provoquent la division cellulaire.

**La matrice extracellulaire (MEC)** est une structure dynamique qui joue un rôle essentiel dans le développement, la migration, la prolifération et la fonction métabolique des cellules avec lesquelles elle se trouve en contact permanent. Les macromolécules constitutives de la MEC sont sécrétées par les cellules dispersées dans la matrice, principalement les fibroblastes. La MEC contient des polysaccharides – glycosaminoglycannes (GAG) qui sont en général liés de manière covalente à des protéines, formant des protéoglycans. La deuxième composante de MEC est constituée de deux types de *protéines fibrillaires* (collagène et élastine) et de *protéines d'adhérence* (fibronectine et laminine).

Les protéines fibrillaires, disposées en réseau, sont responsables de l'organisation de la matrice, et de sa cohésion. Ce réseau protéique est englobé dans un gel hydraté de polysaccharides. La solution aqueuse du gel permet la diffusion de métabolites dans l'espace inter-cellulaire et dans les capillaires sanguins.

### 5.1.2. Ostéoblastes

Les ostéoblastes sont les cellules du tissu osseux. Ce tissu contient quatre type de cellules: i) les ostéoblastes, ii) les ostéocytes, iii) les ostéoclastes et iv) les cellules bordantes (cellules BL) qui couvrent la surface de l'os.

**Les ostéoblastes** sont les cellules majoritaires qui forment l'os et synthétisent les protéines de la matrice osseuse, contrôlent la minéralisation du tissu, présentent des récepteurs pour la vitamine D, les estrogènes et l'hormone parathyroïdienne, secrètent des facteurs avec lesquels ils communiquent avec d'autres types cellulaires (par exemple, les facteurs qui activent les ostéoclastes). Un produit de synthèse d'ostéoblastes est le collagène de type I. Les ostéoblastes qui forment l'os produisent aussi l'ostéocalcine et l'ostéonectine qui constituent 40 à 50% de toutes les protéines non-colagéniques de l'os. D'autres protéines (ostéopontine, sialoprotéine, fibronectine, vitronectine) sont des composants de la MEC auxquels se lient les intégrines.

Les ostéoblastes matures sont essentiels pour la minéralisation de l'os, le processus de dépôt d'hydroxyapatite ; ils contrôlent les concentrations en calcium et en phosphate. Dans les ostéoblastes on trouve des quantités relativement grandes de phosphatase alcaline, à la surface externe de membrane plasmique. Le rôle de la phosphatase alcaline est considéré comme primordial dans la minéralisation de l'os, mais le mécanisme reste encore méconnu. La minéralisation de l'os est produite à une distance de 8 à 10  $\mu\text{m}$  des ostéoblastes. La synthèse de MEC détermine le volume de l'os mais non sa densité. La minéralisation augmente la densité de l'os en remplaçant l'eau, mais ne modifie pas le volume. Une fois leur fonction remplie, les ostéoblastes peuvent avoir trois destins :

- a) une série d'ostéoblastes sont englobés dans la matrice extracellulaire, puis différenciés en cellules matures – ostéocytes – qui ont un rôle de capteurs de la pression mécanique exercée par la masse corporelle, en secrétant des facteurs de croissance qui activent les cellules bordantes ;
- b) d'autres ostéoblastes restent à la surface du nouvel os et se transforment en cellules bordantes ;
- c) le reste des ostéoblastes disparaît par apoptose.

**Les ostéocytes** sont les cellules encapsulées dans les lacunes de la matrice minéralisée. Ces cellules sont caractérisées par une morphologie en étoile. Dix fois plus nombreux que les ostéoblastes, ils représentent le type de cellules osseuses le plus nombreux. Leur distribution est régulée dans la matrice minéralisée et la communication entre eux est réalisée à travers les extensions de la membrane plasmique. Ce type cellulaire est capable de détecter le besoin de croissance osseuse dans le cas d'une

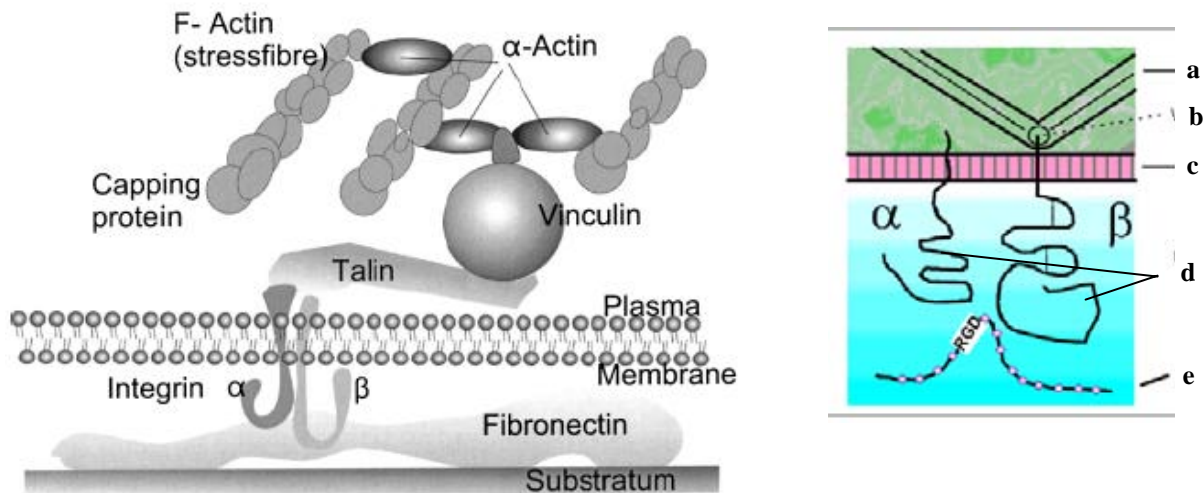
inadaptation fonctionnelle du squelette ou d'endommagements au niveau du tissu. Ils sont sensibles aux changements de flux du fluide interstitiel.

**Les cellules bordantes.** La surface d'un os normal est recouverte d'une couche épaisse de 1 à 2  $\mu\text{m}$  d'une matrice collagénique déminéralisée, sur la surface de laquelle existe une couche des cellules allongées : les cellules bordantes.

**Les ostéoclastes** sont des cellules impliquées dans la résorption du tissu osseux en utilisant leur capacité de sécréter des acides et des enzymes. Les ostéoclastes matures sont des cellules de grande taille (50 – 100  $\mu\text{m}$  de diamètre) multi-noyaux. Ils ont comme caractéristique un système complexe de microvillosités au contact de la zone de la matrice osseuse calcifiée et capable de sécréter de l'acide chlorhydrique qui permet la dissolution des cristaux de phosphate de calcium.

### 5.1.3. L'adhérence des cellules sur un substrat

Les cellules en culture adhèrent entre elles et sur le support sur lequel elles ont été placées. L'adhérence au support se fait par des contacts nommés contacts focaux (Figure 5.2.a). Au niveau de ces contacts, les extrémités de filaments d'actine sont connectées aux intégrines (glycoprotéines transmembranaires) qui peuvent lier des composantes de la matrice extracellulaire, comme la fibronectine, la laminine ou la vitronectine. La connexion entre actine et intégrine est assurée par un complexe incluant plusieurs protéines : actinine, vinculine, taline, tenuine et paxiline.



**Figure 5.2.** Schéma d'une adhérence focale et les protéines impliquées dans ce processus (gauche) ; schéma de l'interaction d'une protéine contenant une séquence RDG, avec un récepteur  $\alpha\text{-}\beta$  intégrine provenant de la membrane cellulaire (droite): a) cytosquelette ; b) actine, vinculine, taline ; c) membrane cellulaire ; d) intégrines  $\alpha\text{-}\beta$  e) protéines avec séquence RGD

Les intégrines se comportent comme des récepteurs qui passent l'information reçue de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule (Figure 5.2.b). L'adhérence cellulaire, le contour, la mobilité et l'expression génétique dépendent de ces informations. Les intégrines reconnaissent les séquences



RGD (Arg-Gly-Asp) et se lie aux protéines qui contiennent ces séquences d'acides aminés (fibronectine, laminine ou vitronectine).

Une étude de l'adhérence cellulaire sur un support doit donc comprendre une évaluation de l'expression des protéines à trois niveaux : protéines extracellulaires, protéines transmembranaires et protéines cytoplasmiques.

Dans notre étude, afin de tenter de comprendre l'influence de la surface d'un biomatériau sur les cellules, des cultures des fibroblastes et d'ostéoblastes ont été réalisées sur les films d'oxydes de titane obtenus par MOCVD et par oxydation anodique.

## 5.2. Etude de l'interaction des fibroblastes avec les dépôts de TiO<sub>2</sub>

La culture des fibroblastes a été réalisée sur des :

- **échantillons de titane** pur, recouverts de la seule couche d'oxyde formée naturellement par exposition à l'air : deux échantillons ont été utilisés, l'un poli 4000, l'autre poli 1200 ;
- **échantillons de titane revêtus de TiO<sub>2</sub>** par le procédé MOCVD, qui diffèrent par leur épaisseur, leur morphologie, leur rugosité et leur composition allotropique ;
- **boîte de culture** en plastique (contrôle).

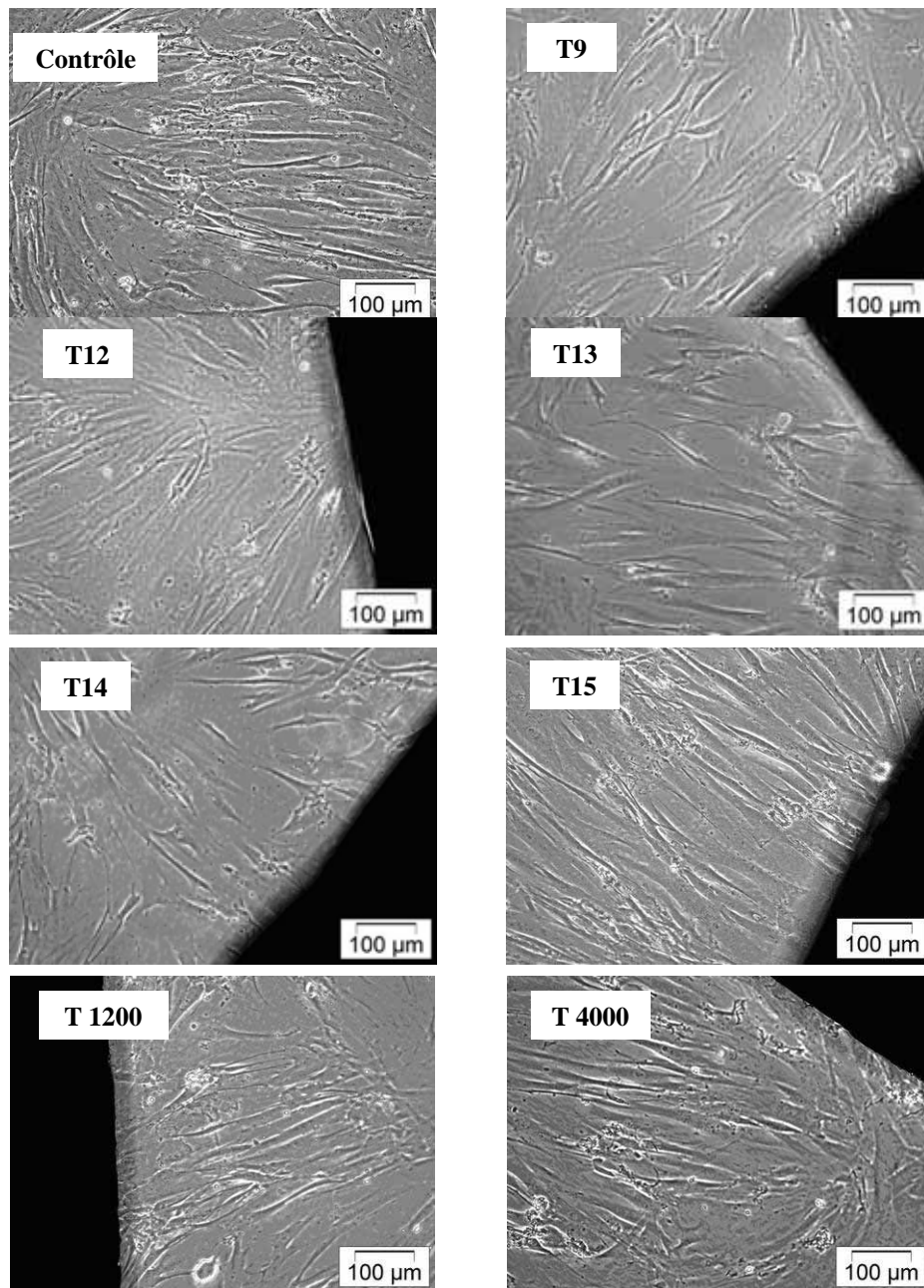
Les principales caractéristiques des films de TiO<sub>2</sub> et des échantillons de titane utilisés dans la culture des fibroblastes sont présentées dans le Tableau 5.1. Les conditions pour les dépôts MOCVD sont :  $P_{\text{tot}} = 20$  torr,  $T_{\text{dépôt}} = 400^{\circ}\text{C}$ ,  $\chi_{\text{TTIP}} = 76 \times 10^{-6}$ . Afin d'obtenir différentes épaisseurs, la durée de dépôt a varié de 90 à 500 minutes.

**Tableau 5.1.** Caractéristiques des échantillons utilisés comme support pour la culture de cellules fibroblastes. Dans la colonne *composition allotropique*, A-R signifie un mélange d'anatase et rutile dans la même proportion, « a » signifie que l'anatase est nettement minoritaire

Code	Polissage initial du substrat de Ti	Rugosité finale Ra (μm)	Epaisseur, (nm)	Composition allotropique	Morphologie	Angle de contact (deg)
T-9	180	0,71	200	A - R	compacte	55
T-12	180	0,75	600	a - R	compacte	9
T-14	180	0,92	1000	A - R	colonnaire	8
T-15	180	1,17	1100	A - R	colonnaire	7
T-13	180	1,34	1600	A - R	colonnaire	7
Ti nu	4000	0,04	-	-	-	60
Ti nu	1200	0,35	-	-	-	60

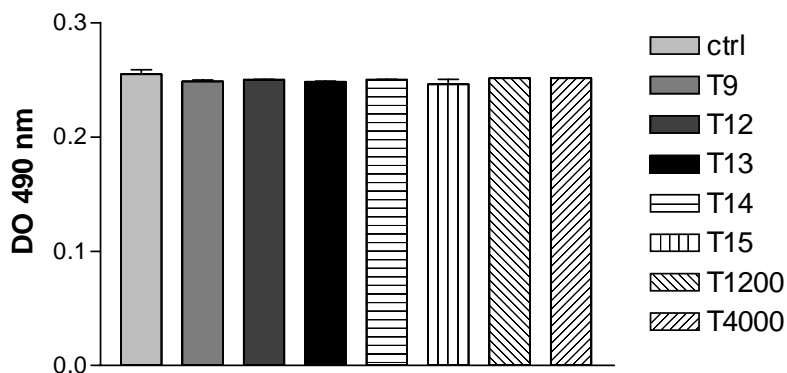
### 5.2.1. Etude de la morphologie des fibroblastes gingivaux et du potentiel cytotoxique des dépôts de $\text{TiO}_2$

La morphologie cellulaire a été observée par microscopie en contraste de phase, à des intervalles de 24 heures, jusqu'à ce que les cellules arrivent à confluence. La Figure 5.3 montre qu'il n'existe pas des différences significatives entre les cellules cultivées sur le support en plastique (contrôle) et les cellules au voisinage immédiat des échantillons testés. Les cellules individuelles ont un aspect fusiforme, formant des plages de même orientation. Pourtant, à proximité des échantillons T13 et T14, la densité cellulaire est plus faible qu'à proximité des autres échantillons. C'est peut être une conséquence de la préférence des fibroblastes pour les surfaces peu rugueuses.



**Figure 5.3.** Morphologie observée par microscopie en contraste de phase, après 72 heures de culture, des cellules fibroblastes cultivées à proximité des échantillons de Ti revêtus et non-revêtus de  $\text{TiO}_2$ . La partie noire des photos représente l'échantillon de titane.

Les éventuels effets cytotoxiques des échantillons de titane et de titane revêtus de TiO<sub>2</sub> ont été recherchés par la détection spectrophotométrique de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) libérée dans le milieu de culture par les cellules dont l'intégrité membranaire est compromise.



**Figure 5.4.** Evaluation comparative de la libération de LDH dans le milieu de culture dans des conditions standard (contrôle) et pour les cellules cultivées sur des échantillons de Ti non revêtus et revêtus de TiO<sub>2</sub>

La Figure 5.4 montre que la viabilité cellulaire n'est pas affectée considérablement en présence du matériau dans le milieu cellulaire. C'est un point de départ, la première preuve que nos nouveaux supports créés pour le développement cellulaire sont biocompatibles. Les valeurs de la densité optique pour les échantillons revêtus de TiO<sub>2</sub> et les échantillons non revêtus sont comparables à celle mesurée pour les fibroblastes cultivés sur support plastique (contrôle).

### 5.2.2. Détermination de la capacité d'adhérence des fibroblastes gingivaux

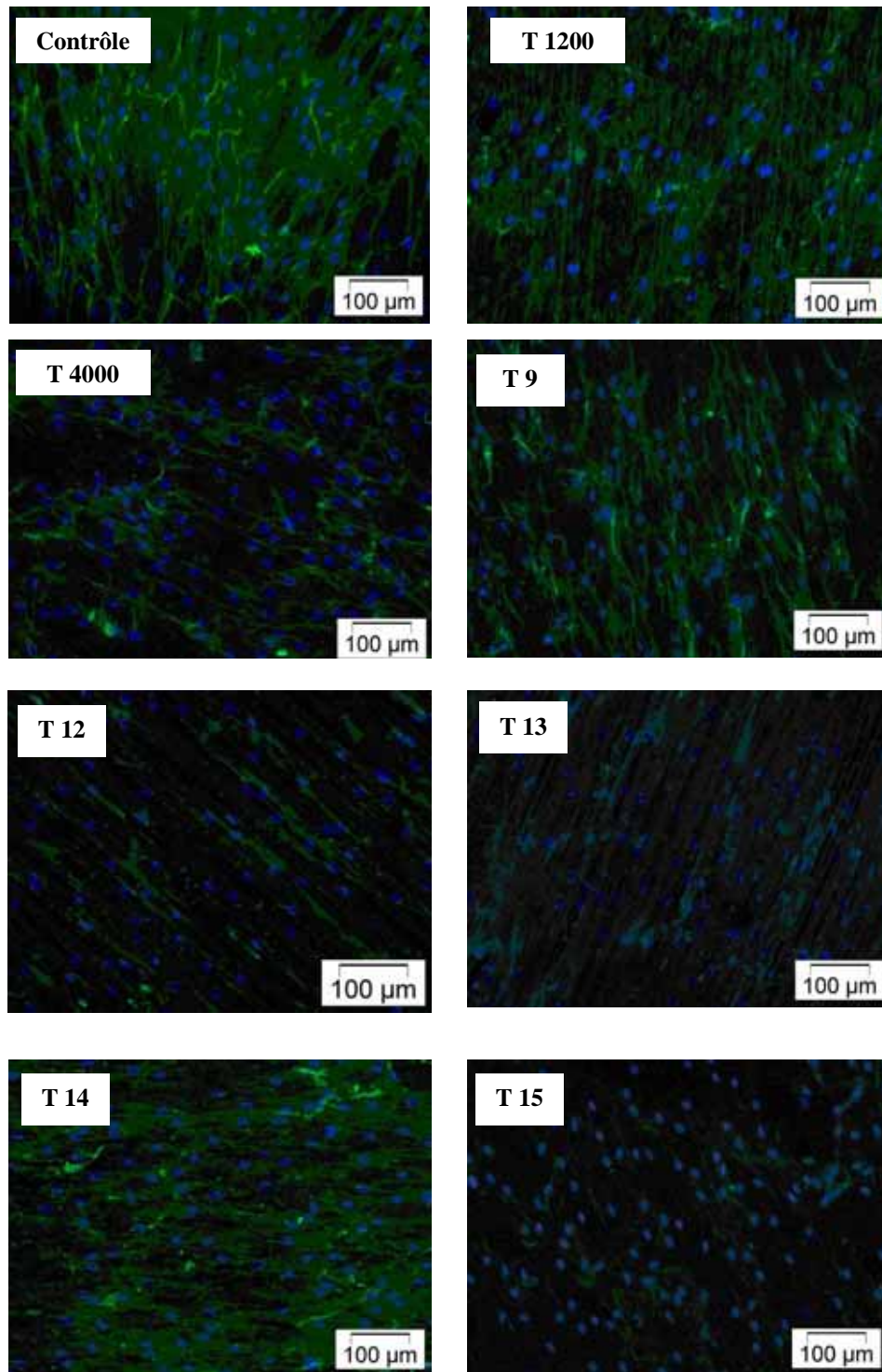
Pendant les processus d'adhérence cellulaire une chaîne de protéines se forme depuis la MEC jusqu'au cytosquelette cortical en traversant la membrane plasmique. Quelques protéines impliquées dans le processus d'adhérence des fibroblastes sur les échantillons d'intérêt ont été identifiées à l'aide des tests présentés dans le Chapitre 2.

#### 5.2.2.1. Mise en évidence de la fibronectine synthétisée par les fibroblastes gingivaux

La MEC joue un rôle important dans le mécanisme de l'adhérence cellulaire sur la surface des biomatériaux [5]. Les fibronectines (FN) sont des protéines d'adhérence, contenues dans MEC, et dont le rôle est de maintenir la forme des cellules, l'organisation du cytosquelette, et la migration et la différenciation cellulaires. Elles forment des réseaux polymères de fibres insolubles. Dans la structure d'une FN, il existe différentes séquences de liaisons, la plus importante étant la séquence RGD, un site d'adhérence pour les intégrines.

Dans l'étude expérimentale, le taux d'expression de la FN sur la surface des échantillons a été évalué. Les cellules ont été maintenues en culture 5 à 7 jours, jusqu'à confluence. La détection de la FN a été réalisée avec des techniques immunochimiques (anticorps monoclonale anti- FN, anticorps

secondaire couple au FITC et analyse au microscope en fluorescence). La densité cellulaire sur le support a été mesurée par la coloration des noyaux au DAPI.



**Figure 5.5** Visualisation des noyaux (coloration au DAPI) et détection de la FN exprimée par les fibroblastes sur le contrôle, les échantillons de Ti non revêtus et ceux recouverts de  $\text{TiO}_2$ .

Les résultats obtenus sur les échantillons de titane non revêtus et sur ceux revêtus de TiO<sub>2</sub> sont présentés sur la Figure 5.5. Ils montrent des taux différents de FN et d'adhérence cellulaire sur les surfaces. Si on compare tout d'abord les trois premiers échantillons, le contrôle et les surfaces de titane non revêtues (T4000 et T1200), on observe une distribution aléatoire du réseau de fibronectine pour le contrôle et pour l'échantillon de titane le plus lisse. Pour les autres échantillons, les filaments de fibronectine sont orientés suivant une direction commune, très probablement induite par la topographie initiale du substrat.

L'échantillon T-9, qui présente la surface la plus lisse ( $R_a = 0,71 \mu\text{m}$ ) parmi les échantillons recouverts de TiO<sub>2</sub>, montre le plus fort signal de marquage pour la FN, comparable à celui du contrôle. Le marquage est presque inexistant pour l'échantillon T13 qui présente le film de TiO<sub>2</sub> le plus rugueux. Les résultats confirment l'influence de la rugosité du film de TiO<sub>2</sub> sur l'adhérence des fibroblastes, et que ces cellules adhèrent mieux sur une surface peu rugueuse. Cependant les surfaces diffèrent également par leur mouillabilité. Il faut donc examiner le rôle joué par ce facteur.

Des données de la littérature affirment que la mouillabilité de la surface affecte le comportement des cellules et que celles-ci se fixent et se distribuent plus facilement sur des surfaces hydrophiles [6]. Mais, d'après d'autres données, la fixation et la croissance des cellules sont favorisées par l'augmentation du caractère hydrophobe [7]. Van Wachem et al. [8] rapportent que l'adhérence de cellules endothéliales humaines est meilleure sur des surfaces d'énergie intermédiaire. Webb et al. [9] ont montré que la fixation et la prolifération des fibroblastes étaient significativement avantagées par le caractère hydrophile de la surface et que les taux de fixation les plus élevés étaient obtenus sur des surfaces modérément hydrophiles.

Notre étude de l'expression de la FN par des fibroblastes gingivaux sur les différents supports montre que le niveau d'expression de la FN décroît dans l'ordre suivant :

$$\text{contrôle} \approx \text{T9} > \text{T4000} > \text{T14} > \text{T1200} \approx \text{T12} \approx \text{T15} > \text{T13}$$

Sur les supports recouverts de TiO<sub>2</sub> par MOCVD, l'expression de la FN atteint ses niveaux les plus faibles sur les surfaces les plus fortement hydrophiles (T12, T13, T14, et T15) et le plus élevé sur l'échantillon T9 dont la surface est modérément hydrophile (angle de contact de l'eau  $\sim 55^\circ$ ) et présente la rugosité plus la faible.

En conséquence, sur les échantillons étudiés, la distribution des filaments de FN produits par les fibroblastes gingivaux dépend aussi bien de la mouillabilité que de la rugosité, les fibroblastes gingivaux préférant une surface lisse à une surface rugueuse et une surface modérément hydrophile à une surface très hydrophile. Le fait que ce type de cellule adhère plus facilement sur les surfaces lisses est confirmé par la meilleure expression de la FN sur T4000 que sur T1200. Rappelons que ces deux échantillons diffèrent par la rugosité tout en présentant le même angle de contact de  $60^\circ$ .

La position de T14 ( $R_a = 0,92 \mu\text{m}$ , très hydrophile) mieux classé que T12 ( $R_a = 0,75 \mu\text{m}$ , très hydrophile) peut surprendre. Nous examinerons ce point plus en détail dans le paragraphe suivant.

#### **5.2.2.2. Mise en évidence des intégrines – les récepteurs qui facilitent l'adhérence des fibroblastes gingivaux à la matrice extracellulaire**

Par rapport à d'autres récepteurs existant sur la surface des cellules, les intégrines ont une affinité plus faible pour la liaison de ligands et sont présentes dans une concentration de 10-100 fois plus forte. Les intégrines reconnaissent leurs ligands et se lient à eux quand une certaine concentration est atteinte, un nombre minimal de molécules, dans les contacts focaux. Les cellules peuvent se lier par une liaison faible simultanément à plusieurs molécules ligand. Si les intégrines se lient à leurs ligands par des liaisons fortes alors elles sont fixées irréversiblement à la MEC et ne peuvent pas se déplacer. Les interactions intégrine–ligand sont accompagnées par la concentration et l'activation d'intégrines sur la surface des cellules et par la transmission des signaux qui déclenchent plusieurs événements cellulaires. L'adhérence va de pair avec l'activation de voies de signalisation qui favorisent la prolifération, déclenchent la différenciation, s'oppose à l'apoptose. La signalisation à l'aide des intégrines dépend de la formation des contacts focaux, des sites dynamiques dans lesquels les protéines de cytosquelette et d'autres protéines sont concentrées, en contrôlant la migration et la forme de cellules.

Le niveau d'expression de l'intégrine  $\beta 1$  pour le contrôle et les deux échantillons de titane non revêtus et les échantillons de titane revêtus d'oxyde est présenté sur la Figure 5.6. On constate dans tous les cas une distribution diffuse du signal sur toute la surface cellulaire avec une concentration dans la région péri-nucléaire. La concentration d'intégrine  $\beta 1$  dans la région peri-nucléaire peut représenter soit des accumulations intracellulaires de molécules d'intégrines néo-synthétisées, soit l'existence d'un réservoir des intégrines qui ne sont pas recrutées au niveau de surface cellulaire.

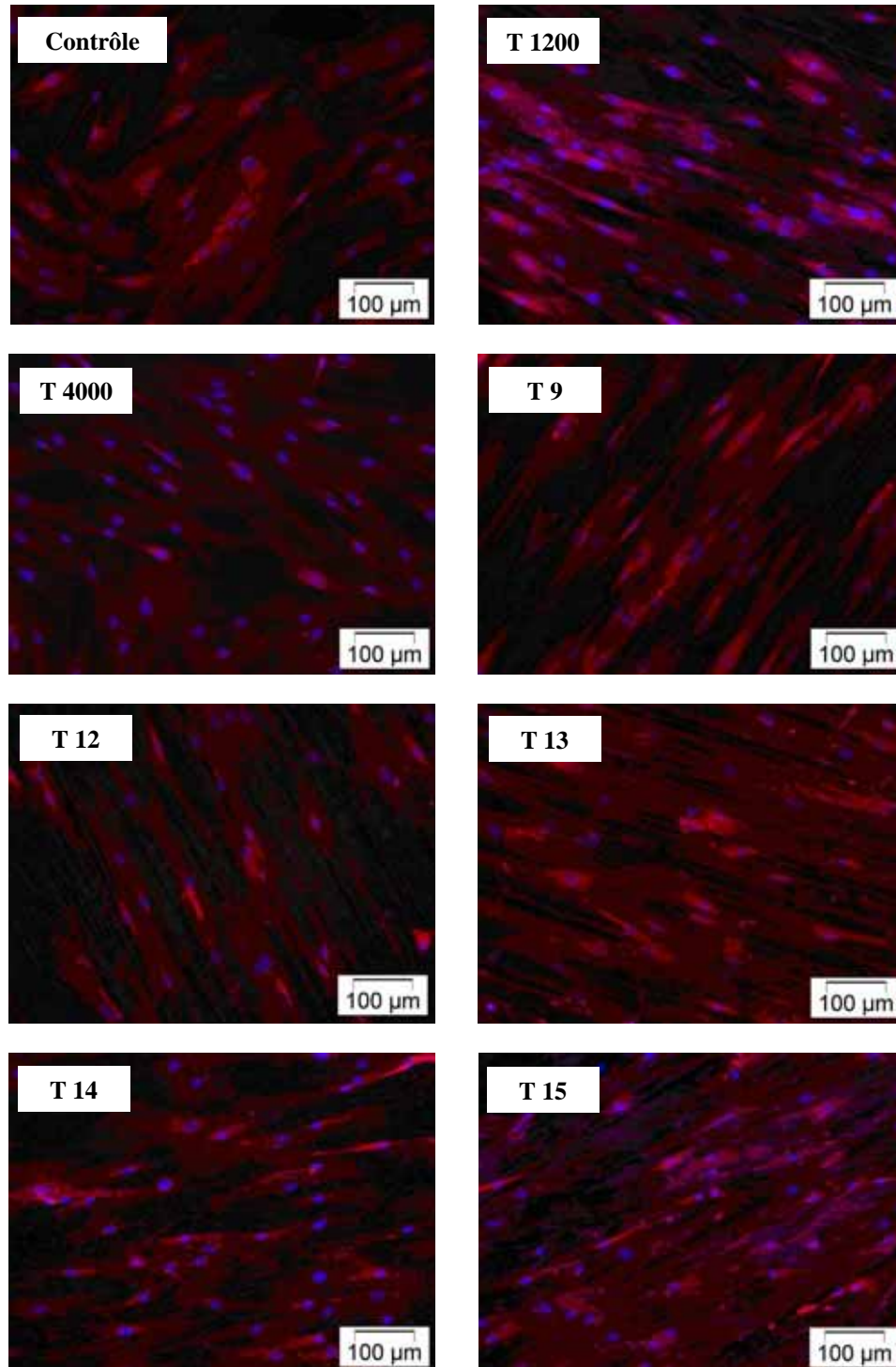
Le classement suivant peut être proposé :

$$\text{contrôle} \approx \text{T9} > \text{T4000} \approx \text{T1200} > \text{T14} \approx \text{T12} > \text{T15} > \text{T13}$$

La fréquence la plus faible de cellules qui donnent des signaux fluorescents spécifiques de l'intégrine  $\beta 1$  est observée pour les échantillons T13 et T15 qui correspondent aux dépôts de TiO<sub>2</sub> les plus rugueux. Comme lors de la mise en évidence de la FN, c'est l'échantillon T9, qui correspond au dépôt MOCVD le plus mince et le plus lisse, qui montre le plus fort signal du marquage de l'intégrine  $\beta 1$ , suggérant que cette surface permet une forte adhérence des fibroblastes gingivaux.

Ces résultats démontrent que dans le cas des échantillons revêtus de TiO<sub>2</sub> aussi, la rugosité de surface influence le taux d'expression d'intégrine  $\beta 1$  par les fibroblastes gingivaux, comme dans l'étude de Oates et al [10]. Les résultats obtenus par ce groupe de recherche ont mis en évidence que les fibroblastes gingivaux développées en contact avec les surfaces de titane lisses présentent un niveau significativement élevé d'ARNm spécifique aux intégrines  $\beta 1$  par rapport aux cellules développées sur un support en plastique. Sur les surfaces rugueuses ce niveau est moyen.





**Figure 5.6.** La détection en fluorescence de l'intégrine  $\beta 1$  exprimée par les fibroblastes gingivaux sur des échantillons de Ti non revêtus et revêtus d'oxyde de titane

Pour les deux échantillons de titane non traités par MOCVD T4000 et T1200, on ne remarque pas de différence dans la fréquence des cellules marquées. Cependant, l'intensité de la fluorescence paraît distribuée de façon homogène sur les cellules cultivées sur l'échantillon le plus lisse (T4000), alors que sur la surface la moins lisse (T1200), le signal est fréquemment plus brillant à proximité du noyau. Cela pourrait signifier que, pour les cellules cultivées sur T1200, les intégrines sont plutôt

accumulées à l'intérieur des cellules et donc que les voies de signalisation qui déclenchent les événements cellulaires (tels que la prolifération, la différenciation, la survie) ne sont pas activées. Au contraire, pour les cellules cultivées sur T4000, l'interaction cellule-substrat permet à la fonction cellulaire de se développer normalement.

Il est intéressant de comparer les deux classements obtenus pour l'expression de la FN et de l'intégrine  $\beta 1$  :

contrôle  $\approx$  T9 > T4000 > T14 > T1200  $\approx$  T12  $\approx$  T15 > T13      FN

contrôle  $\approx$  T9 > T4000  $\approx$  T1200 > T14  $\approx$  T12 > T15 > T13      ITN  $\beta 1$

Ces classements diffèrent essentiellement en leur centre, par les positions des échantillons T1200 et T14. On constate, en particulier, que le premier classe T14 devant T12, alors que le second les met à égalité. Les couches d'oxyde de ces deux échantillons diffèrent par la composition allotropique – T12 est plus riche en rutile que T14 – et par leur morphologie en section transverse – celle de T12 est compacte, celle de T14 est colonnaire. Si les seuls facteurs jouant sur l'adhérence étaient la rugosité et la mouillabilité, on devrait avoir T12 > T14. Comme ce n'est pas le cas dans l'un et l'autre classement, il est permis de penser que la composition allotropique et/ou la morphologie en section transverse ont également une influence sur l'adhérence des fibroblastes gingivaux.

Les études d'adhérence ont montré que les fibroblastes gingivaux cultivées sur les surfaces testées expriment avec des taux différents les molécules impliquées dans l'adhérence cellulaire : la fibronectine et l'intégrine  $\beta 1$ , ce qui suggère une manifestation différente des interactions cellule–support. Par rapport au contrôle, on peut conclure pour les fibroblastes cultivés sur les échantillons de titane non revêtus et revêtus de  $\text{TiO}_2$  :

- les filaments de FN sont distribués aléatoirement dans le cas des fibroblastes développés sur le titane non revêtu le plus lisse et sur le contrôle ;
- l'échantillon de titane non revêtu T1200 et les échantillons revêtus T9 à T15 ont permis aux cellules étalées de synthétiser et de former un réseau de filaments orientés dans une direction très probablement induite par la topographie du substrat ;
- le niveau d'expression de la FN dans les cellules développées sur T1200 et T4000 est inférieur à celui du contrôle ;
- l'échantillon T9, qui présente la couche de  $\text{TiO}_2$  la plus mince, la surface la plus lisse et un caractère modérément hydrophile, a manifesté un comportement semblable à celui du contrôle dans le test du marquage FN-DAPI, tandis que les échantillons T13 et T15, dont les dépôts sont les plus épais, les plus rugueux, et très hydrophiles ont donné un signal très faible ;



- la fluorescence la plus intense, semblable à celle manifestée par le contrôle, pour la mise en évidence de l'intégrine  $\beta 1$  est observée pour l'échantillon T9, suggérant que ces surfaces permettent une forte adhérence des fibroblastes gingivaux ;

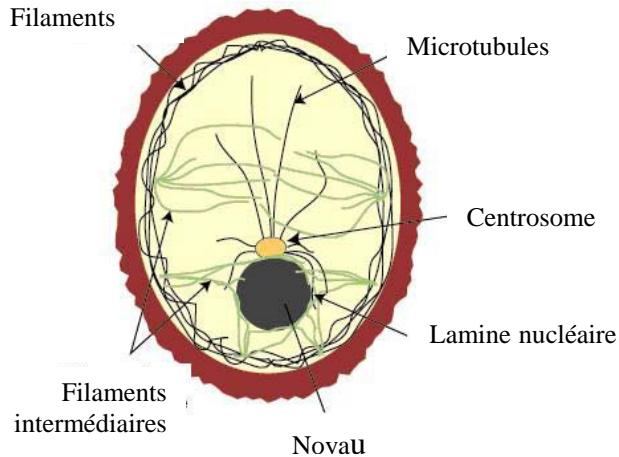
- le niveau d'expression de l'intégrine  $\beta 1$  dans les cellules développées sur T1200 et T4000 est inférieur à celui du contrôle, l'intensité des signaux de fluorescence étant homogène sur les cellules cultivées sur T4000 mais fréquemment plus forte autour du noyau des cellules cultivées sur T1200, ce qui suggère que la rugosité pourrait influencer la circulation des signaux de la matrice extracellulaire vers le noyau via les intégrines ;

- les échantillons T13 et T15, les plus hydrophiles, montrent le plus faible signal de marquage de l'intégrine  $\beta 1$  ;

- La comparaison des comportements des cellules sur les échantillons T12 et T14 dans les deux tests d'expression permet de penser indirectement que la composition allotropique et/ou la morphologie en section transverse du dépôt d'oxyde pourrait avoir une influence sur l'adhérence des fibroblastes gingivaux.

### **5.2.3. Modifications dans l'expression des quelques protéines du cytosquelette**

Le cytosquelette forme un réseau de filaments et microtubules. Les principaux constituants de ces filaments sont les protéines qui contrôlent la forme, organisent les cellules et leurs mouvements. Dans la structure de ce réseau, on trouve trois types de filaments protéiques, montrés sur la Figure 5.7 : des filaments minces et flexibles d'actine, et des filaments intermédiaires, des microtubules, structures cylindriques organisées autour du centrosome.



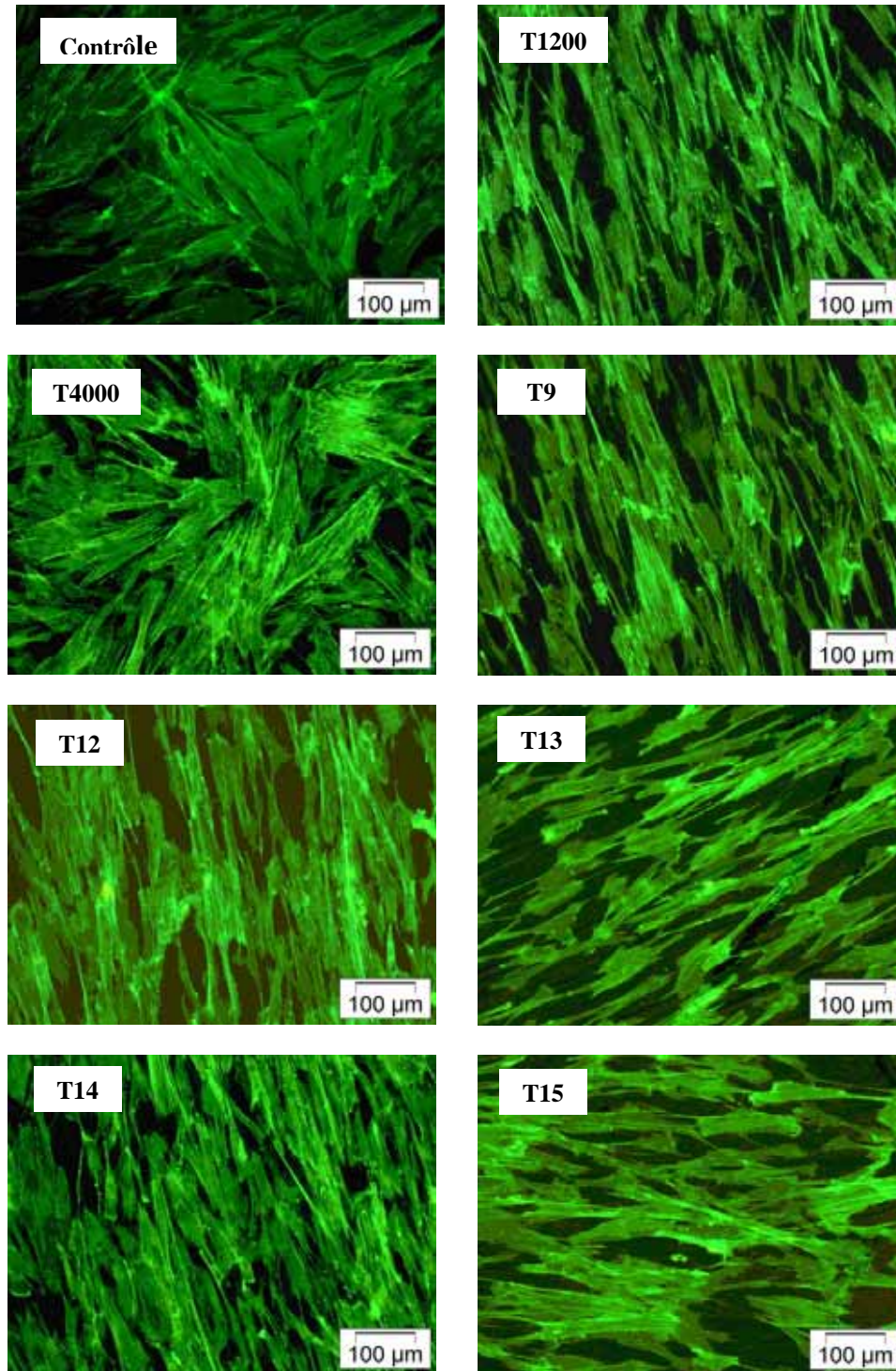
**Figure 5.7** La structure de réseau du cytosquelette.

L'actine est une composante majeure du cytosquelette, impliquée dans plusieurs fonctions cellulaires, comme la contraction, la mobilité, la division, les mouvements des organites. Les cellules se contractent en présence d'ATP, grâce à la formation de longs faisceaux de micro filaments qui traversent le corps cellulaire et se terminent dans des plaques denses à la base de la cellule. Ces faisceaux sont nommés *fibres de stress*, parce qu'elles se forment en réponse à l'application d'une tension mécanique. Les fibres de stress sont des microfilaments formés des molécules d'actine G (globulaire), assemblées en longs faisceaux (l'actine F), qui ont, entre autres, pour rôle l'attachement des cellules sur un support. Schober et al. [11] ont prouvé que l'interaction entre le système microtubulaire, constitué de quantités équimoléculaires de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$ , et le cytosquelette d'actine est un processus fondamental de la régulation de la formation des prolongations cytoplasmiques (filopodes) et de la mobilité cellulaire.

Dans notre étude expérimentale, parmi toutes les protéines du cytosquelette, nous avons étudié l'expression d'actine et de tubuline  $\alpha$ . Les expressions de ces protéines sur les surfaces à analyser sont présentées sur les clichés de la Figure 5.8 et la Figure 5.9.

#### 5.2.3.1. Evaluation de l'expression d'actine

La figure 5.8 présente l'expression d'actine dans le cytosquelette des fibroblastes développés sur la surface contrôle, les différentes surfaces de titane non revêtu et celles de titane revêtu de  $\text{TiO}_2$ . Ce marquage donne des indices sur la morphologie et l'orientation des cellules développées sur ces surfaces. Ainsi, sur les surfaces les plus lisses, telles que celles du contrôle et de l'échantillon T4000, les fibroblastes sont orientées aléatoirement, et présentent toutes une morphologie identique de cellule bien étalée.



**Figure 5.8.** Visualisation par microscopie confocale de l'expression d'actine-F dans le cytosquelette des fibroblastes sur le contrôle, les échantillons de titane non revêtu (T1200 et T4000) et de titane revêtu de  $\text{TiO}_2$  par MOCVD (T9, T12, T13, T14, T15).

Les fibroblastes cultivés sur le titane non revêtu T1200 (plus rugueux que T4000) et sur les surfaces de  $\text{TiO}_2$  présentant différents degrés de rugosité, sont allongées et alignées approximativement parallèles les unes aux autres. Meyle et al. [12] ont montré que les fibroblastes gingivaux sont orientés (phénomène de *guidance contact*) et qu'ils sont capables de modifier leur

morphologie en fonction de la topographie de la surface des supports. Les surfaces rugueuses favorisent un alignement des cellules, observé aussi dans notre étude. De plus, les cellules développées sur titane non revêtu T1200, sur les échantillons T9 et T12 revêtus d'une couche compacte de TiO<sub>2</sub>, et sur l'échantillon T14 où la couche, de structure colonnaire, est modérément rugueuse, ont des morphologies semblables, très allongées, avec de nombreux filopodes de longueurs variables. Sur les surfaces revêtues de TiO<sub>2</sub>, avec une morphologie colonnaire et les plus fortes rugosités (T13 et T15), les fibroblastes gingivaux présentent un aspect fusiforme avec des filopodes allongés aux extrémités. Les filopodes contiennent des faisceaux de filaments d'actine et forment des contacts focaux qui assurent la communication des cellules avec le milieu extracellulaire et facilitent la mobilité cellulaire. Pour tous les échantillons, les filaments d'actine sont dispersés dans l'entière masse cytoplasmique. On distingue aussi des fibres de stress (des structures filiformes fortement fluorescentes) qui déterminent la forme des cellules, remodelent la MEC et sont impliquées dans la mobilité cellulaire. A l'exception des échantillons à surface lisse (contrôle et T4000) où les fibres de stress, parallèles entre elles, sont distribuées au hasard, les fibres de stress sont alignées, sous l'effet des forces de tension exercées par les supports. De plus, les cellules développées sur titane revêtu du film de TiO<sub>2</sub> le plus épais (T13) présentent une concentration de filaments d'actine sous forme de clusters, moins des fibres de stress orientées parallèlement, ce qui suggère une perturbation des interactions avec le substrat.

Il est difficile d'utiliser l'expression d'actine F pour classer les échantillons sur la base des signaux de fluorescence obtenus. Pourtant, on peut affirmer que les supports qui paraissent affecter le réseau des filaments d'actine après leur concentration dans certaines régions sont T13 et, dans une moindre mesure, T12 et T14.

#### **5.2.3.2. Evaluation de l'expression de la tubuline $\alpha$**

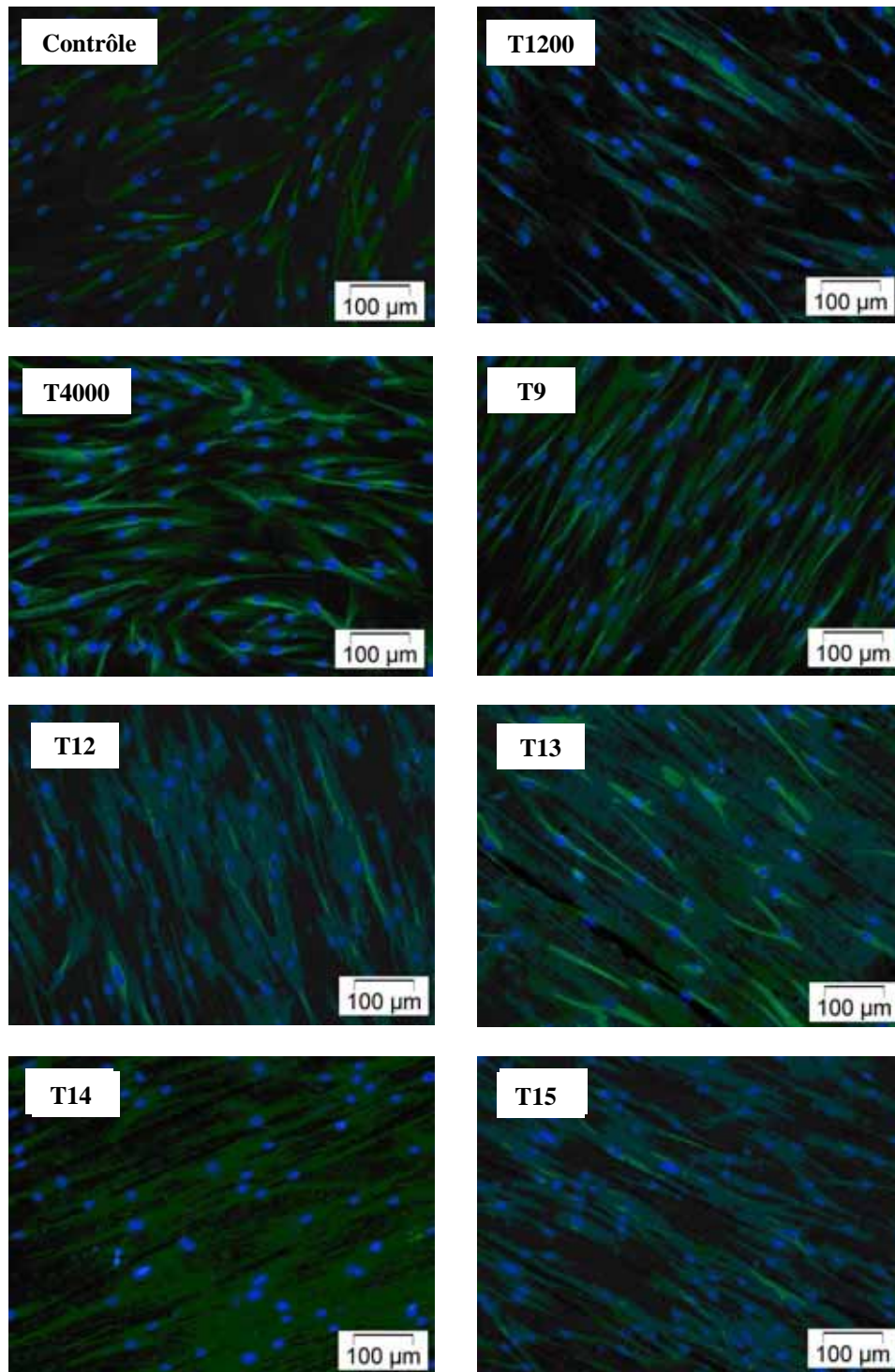
Les résultats de l'étude immunocytochimique de l'expression de la tubuline  $\alpha$  et du marquage des noyaux au DAPI sont présentés sur la Figure 5.9. L'influence des caractéristiques micro-morphologiques des surfaces sur l'orientation des cellules HGF-1 apparaît clairement : les surfaces lisses (le contrôle et T4000) déterminent une distribution aléatoire des cellules, tandis que les surfaces plus rugueuses (T1200 et les échantillons de titane revêtu d'oxyde) déterminent une distribution unidirectionnelle.

Cette analyse immunocytochimique de l'expression de tubuline  $\alpha$  montre des cellules pour lesquelles l'intensité du signal fluorescent est homogène sur l'ensemble du cytoplasme, et des cellules pour lesquelles ces signaux sont concentrés près du noyau (indice de la participation des microtubules à la mitose) ou dans les prolongations cytoplasmiques (indice de la participation des microtubules à la motilité cellulaire).

A l'exception de l'échantillon T4000, les filaments de tubuline  $\alpha$  sont alignés dans une même direction sur tous les échantillons. Ils sont mieux exprimés sur les échantillons les plus lisses, T4000 et



T9. Le plus faible marquage est observé pour les fibroblastes gingivaux cultivés sur l'échantillon revêtu de  $\text{TiO}_2$ , T14.



**Figure 5.9.** Visualisation par microscopie confocale de l'expression de tubuline  $\alpha$  dans le cytosquelette des cellules fibroblastes sur le contrôle, les échantillons de titane non revêtus (T1200 et T4000) et de titane revêtus de  $\text{TiO}_2$  (T9, T12, T13, T14, T15).

L'examen de l'expression de deux protéines du cytosquelette des fibroblastes gingivaux, l'actine et la tubuline  $\alpha$ , a conduit aux conclusions suivantes :

- les fibroblastes gingivaux s'orientent et modifient leur morphologie en fonction de la topographie de surface du support : les surfaces rugueuses (T1200 et titane revêtu de TiO<sub>2</sub>) favorisent un alignement des cellules, tandis que les surfaces plus lisses (contrôle et T4000) favorisent une distribution aléatoire ;

- les filaments d'actine sont dispersés dans l'ensemble de la masse cytoplasmique ; on trouve également des fibres de stress : sur les échantillons à surface rugueuse (Ti1200 et titane revêtu de TiO<sub>2</sub>), ces fibres sont alignées sous l'effet de forces de tension exercées par le substrat sur les cellules ; sur T13 et, dans une moindre mesure, sur T12 et T14, leur organisation est perturbée;

- l'examen de l'expression de la tubuline  $\alpha$  conduit à des observations similaires : à l'exception du contrôle et de l'échantillon T4000, les filaments de tubuline  $\alpha$  sont distribués selon une seule direction sur tous les échantillons étudiés. L'expression est maximale sur T4000 et T9 ; le marquage le plus faible est observé sur l'échantillon T14.

#### 5.2.4. Le potentiel prolifératif des fibroblastes gingivaux

La prolifération cellulaire et la mise en évidence des matériaux et des substances qui promeuvent ou inhibent la prolifération sont des sujets d'études capitaux en biologie cellulaire, particulièrement quand on s'intéresse à la biocompatibilité. Une des nombreuses techniques de détermination de la prolifération cellulaire consiste à détecter l'incorporation de bromodéoxyuridine (BrdU) dans les molécules d'ADN récemment synthétisées par les cellules en train de proliférer. Nous avons utilisé cette technique. Il en existe d'autres qui s'appuient sur l'utilisation de marqueurs protéiques ou sur la mesure d'activités enzymatiques associées à la prolifération. L'examen de l'expression de l'antigène de prolifération nommée PCNA (*Prolifération Cell Nuclear Antigen*) et celui de l'expression la protéine Ki67 font partie de ces techniques et nous les avons également utilisées dans cette étude.

Les tests de prolifération sont liés aux quatre phases du cycle cellulaire :

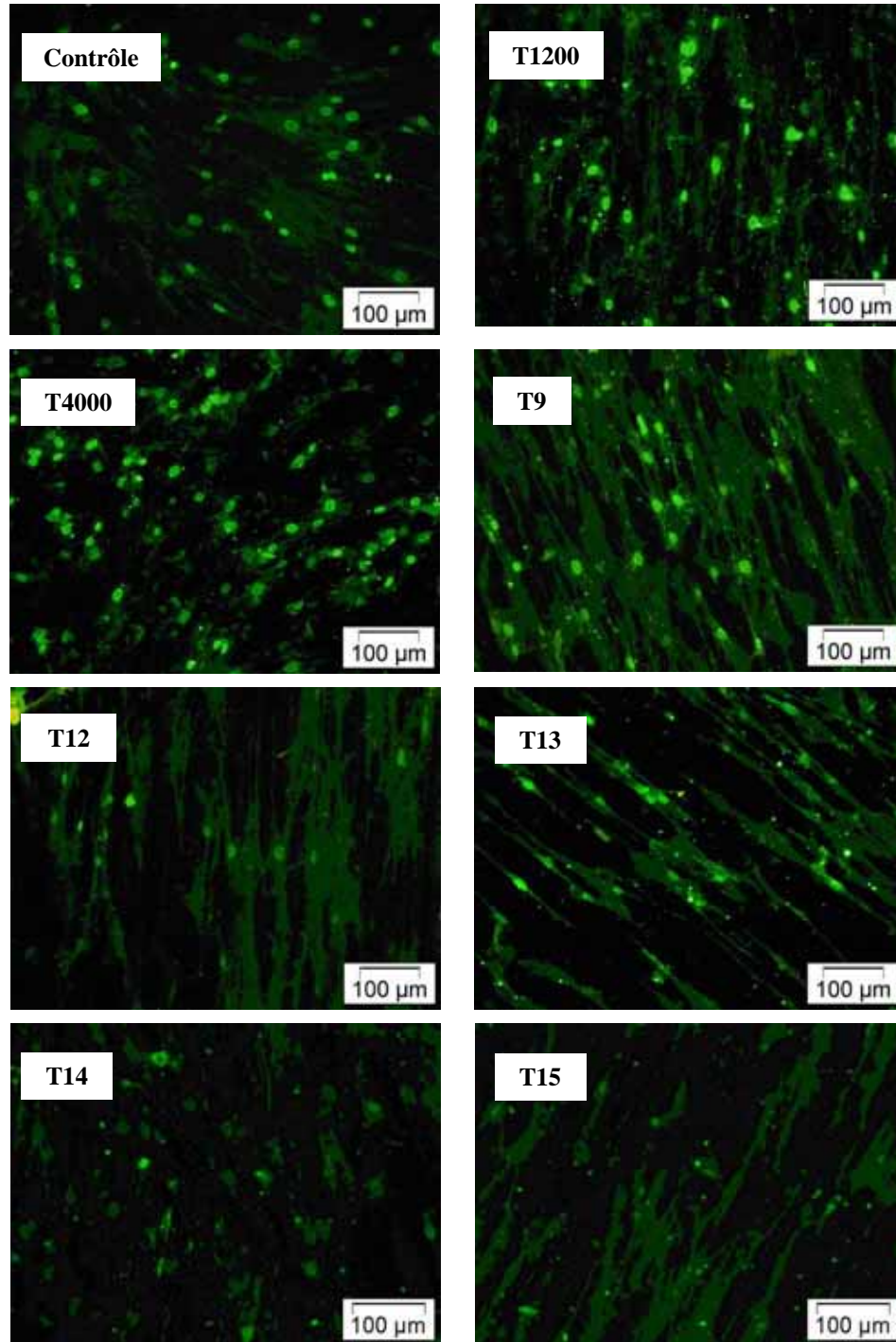
- **phase G1** : soit la cellule grossit et s'achemine vers la synthèse d'ADN et un autre cycle de division, soit elle sort du cycle, dans la phase G0 ;
- **phase S** : synthèse d'ADN ;
- **phase G2** : la cellule continue à grossir (prise de masse) et se prépare à la mitose ;
- **phase M** : mitose (phase de division cellulaire).

##### 5.2.4.1. Test de détection du BrdU

L'évolution du potentiel prolifératif manifesté *in vitro* par les fibroblastes en contact avec les échantillons a été évaluée en ajoutant du BrdU dans le milieu de culture et en détectant par

microscopie de fluorescence celles des cellules qui étaient dans la phase de réplication d'ADN (phase S) et qui avaient donc incorporé du BrdU. Les anticorps anti – BrdU détectent le BrdU incorporé dans l'ADN double brin dénaturé ou désintégré. Le BrdU a été détecté par une méthode immunocytochimique.

La densité des noyaux fluorescents des fibroblastes cultivés sur le contrôle, les deux surfaces de titane de rugosités différentes et les surfaces de titane revêtues de  $\text{TiO}_2$  est montrée sur la Figure 5.10.



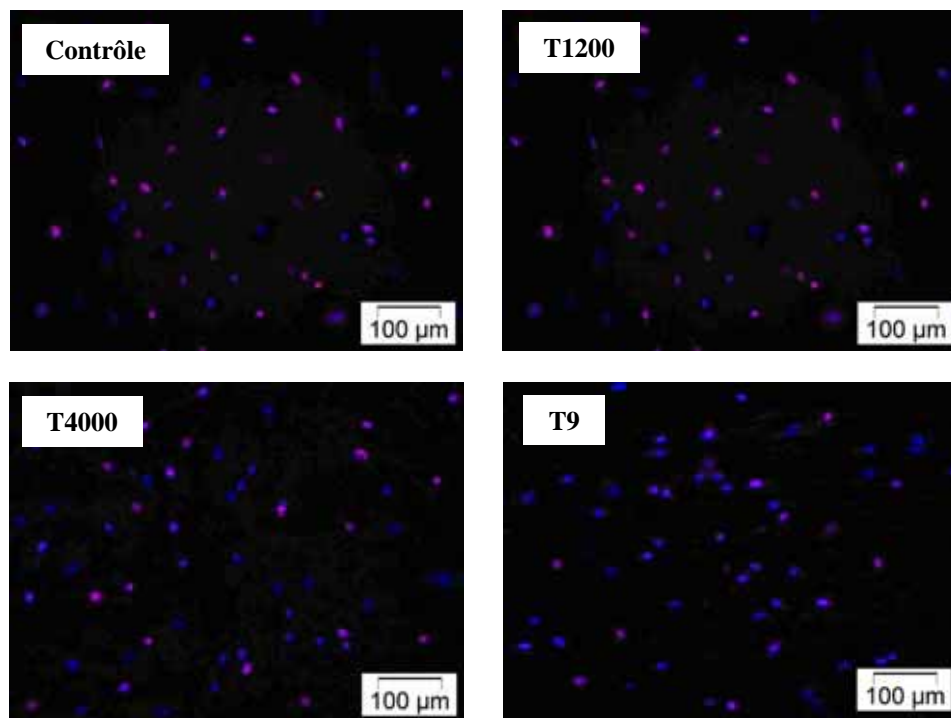
**Figure 5.10** Détection par immunofluorescence du BrdU incorporé pendant la synthèse d'ADN par les fibroblastes développées sur le contrôle et les échantillons de titane non revêtus et revêtus de  $\text{TiO}_2$

L'étude du potentiel prolifératif manifesté par les fibroblastes montre que les noyaux fluorescents sont plus nombreux sur les surfaces les plus lisses : contrôle, T4000, T1200 et T9. De tous les échantillons recouverts de TiO<sub>2</sub>, aucun échantillon ne montre un taux de prolifération plus élevé que le contrôle. Celui qui montre la plus grande fréquence de noyaux fluorescents est l'échantillon T9, recouvert d'un film d'oxyde peu rugueux et modérément hydrophile. On observe moins de cellules marquées sur les surfaces rugueuses et très peu sur la surface de T15. Cet examen n'a pas permis d'élucider l'influence de la couche de TiO<sub>2</sub> sur la prolifération mais on peut affirmer que l'augmentation de la rugosité l'influence négativement.

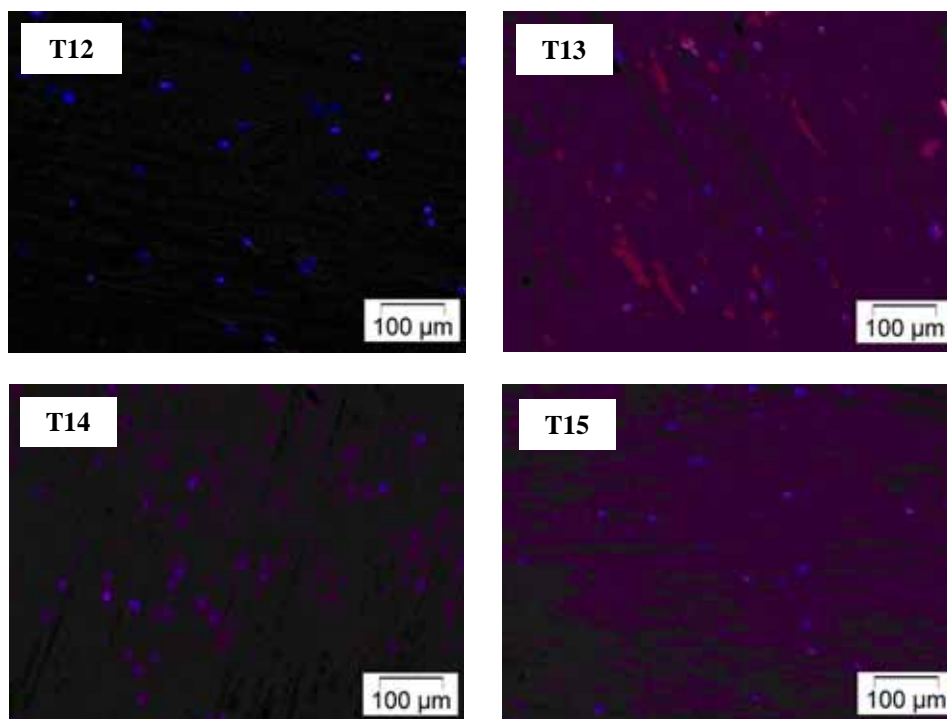
#### 5.2.4.2. Test de détection du marqueur Ki67

L'évaluation du potentiel prolifératif par la méthode d'incorporation du BrdU dans les fibroblastes a été complétée avec l'analyse par immunofluorescence de l'expression du marqueur de prolifération Ki67 par les cellules. La protéine nucléaire Ki67 joue un rôle central dans la prolifération cellulaire et est un marqueur excellent pour déterminer la fraction de croissance d'une population cellulaire. Elle est présente dans les quatre phases active du cycle cellulaire, avec un maximum dans la phase M. Mais elle est absente dans les cellules quiescentes (phase G0), les cellules en début de phase G1 et dans celles où l'ADN est en cours de réparation [13]. Pendant l'interphase, l'antigène Ki67 peut être détecté exclusivement dans le noyau cellulaire, tandis que pendant la mitose la plupart de cette protéine est relocalisée sur la surface de chromosomes.

La Figure 5.11 présente les micrographies en fluorescence obtenues après la localisation immunocytochimique de la protéine Ki67 combinée au marquage des noyaux au DAPI.







**Figure 5.11.** Détection par immunofluorescence de la protéine Ki67 et visualisation des noyaux dans les fibroblastes sur le contrôle et les échantillons de Ti non revêtus et revêtus de TiO<sub>2</sub>

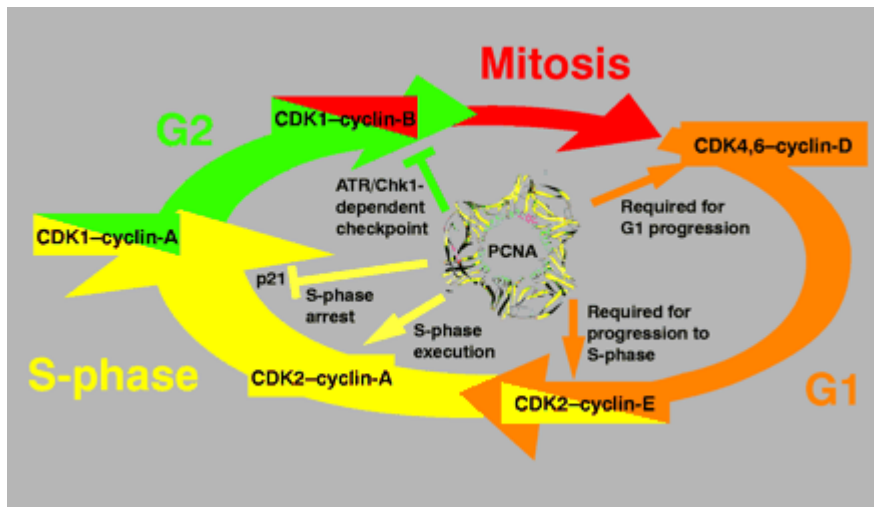
Le résultat de cette analyse est apprécié en fonction de la valeur du rapport entre le nombre total de noyaux (coloration bleu) et celui des noyaux positifs pour Ki67 (coloration rose). La fréquence des fibroblastes gingivaux positifs pour Ki67, par rapport au nombre total de noyaux, est plus faible pour T9 que pour le contrôle et pour T4000. Sur les surfaces plus rugueuses (T13, T14 et T15), ou nettement plus riche en rutile qu'en anatase (T12), la présence des cellules marquées positivement pour Ki67 est extrêmement réduite : il n'y a donc que quelques cellules en cours de division active sur ces surfaces.

#### 5.2.4.3. Test de détection du marqueur PCNA

Cet examen du potentiel prolifératif manifesté par les fibroblastes gingivaux a été complété par la recherche du niveau d'expression protéique de l'antigène nucléaire de prolifération cellulaire (PCNA) par la technique du *Western blotting*.

Le PCNA est une protéine auxiliaire de l'ADN, localisée dans le noyau, principalement dans les cellules en phase S du cycle cellulaire [14]. Sa présence est corrélée à l'état prolifératif des cellules dans la culture. Elle s'accumule dans la phase G1 et atteint sa concentration maximale pendant la phase S. Cette concentration diminue au cours des phases G2 et M. Le PCNA, ensemble avec d'autres protéines, est impliqué directement dans la réplication et la réparation de l'ADN [15]. Dans la Figure 5.12 sont présentées les interactions de PCNA avec différentes composantes qui règlent le cycle

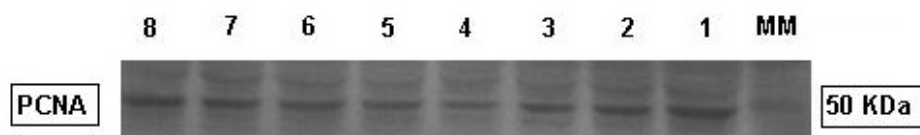
cellulaire comme toutes les CDK-cyclines et avec les protéines des points de contrôle critiques impliquées dans la traduction des signaux positifs (indiqués par les flèches) ou négatifs (indiqués par T).



**Figure 5.12.**

Les interactions de la PCNA avec les protéines du cycle cellulaire.

L'analyse de niveau d'expression de PCNA par la méthode *Western blotting* a été réalisée en utilisant des quantités égales de protéines provenant des cellules développées sur les surfaces d'intérêt. Le niveau d'expression de PCNA dans les lysats cellulaires pour tous les échantillons est montré sur la Figure 5.13. Les concentrations les plus fortes de PCNA sont enregistrées pour le contrôle, les échantillons de titane non revêtus et pour l'échantillon T9 revêtu de 200 nm d'oxyde. Le niveau d'expression de PCNA confirme que les fibroblastes préfèrent les surfaces les moins rugueuses.



**Figure 5.13** Détection de l'expression de PCNA par *western blotting* dans le lysat de fibroblastes cultivés sur : 1- le contrôle ; les échantillons TiO<sub>2</sub>/Ti : 2) T9 ; 3) T12 ; 4) T13 ; 5) T14 ; 6) T15 ; et les échantillons de Ti non-revêtus : 7) T1200 ; 8) T4000. MM – marqueur de masse moléculaire

Après l'étude du potentiel prolifératif (synthèse ADN et l'expression de marqueurs de prolifération Ki67, PCNA) des fibroblastes, on peut souligner que le nombre le plus élevé de noyaux fluorescents après l'incorporation du BrdU a été enregistré pour l'échantillon T4000 et le contrôle, suivi par l'échantillon T9 qui présente la surface la plus lisse d'entre les échantillons couverts de TiO<sub>2</sub>. La rugosité est probablement le facteur déterminant dans l'expression des marqueurs de prolifération Ki67 et protéine PCNA. Pour les surfaces les plus rugueuses, la présence de fibroblastes positifs pour Ki67 est quasiment nulle. Il est possible également que la teneur en rutile joue un rôle : les échantillons T9 et T12 ont à peu près la même rugosité (0,71  $\mu$ m et 0,75  $\mu$ m respectivement), mais T12 est plus riche en rutile que T9 et exprime moins le marqueur Ki67.

Tous ces résultats montrent que les fibroblastes gingivaux manifestent un taux élevé de prolifération sur les échantillons de Ti non revêtus et sur l'échantillon revêtu de la couche de TiO<sub>2</sub> la plus fine, préférant donc les surfaces les plus lisses.

#### 5.2.5. Mise en évidence de l'activité des métalloprotéases de matrice (MMP) impliquées dans la dégradation des molécules de la matrice extracellulaire

On sait actuellement que le processus d'adhérence cellulaire passe par des récepteurs cellulaires de surface spécifiques pour les molécules de la MEC. Il est possible que l'étalement cellulaire soit précédé par la sécrétion par les cellules de protéines et de protéoglycans. Ceux-ci adhèrent sur le support, puis les cellules s'attachent sur la matrice à travers les récepteurs spécifiques.

Cette étude a visé la mise en évidence des enzymes MMP impliquées dans la dégradation des molécules de la MEC. Les MMP sont une famille de protéases dépendantes du zinc, capables de dégrader les composantes protéiques structurales de la MEC et des composantes présentes sur la surface cellulaires, *in vitro* et *in vivo*. Les MMP participent à différents processus cellulaires, par exemple l'adhérence, la migration et la prolifération, et sont impliqués dans des mécanismes pathologiques [16]. Dans les conditions normales, l'expression de MMP est minimale.

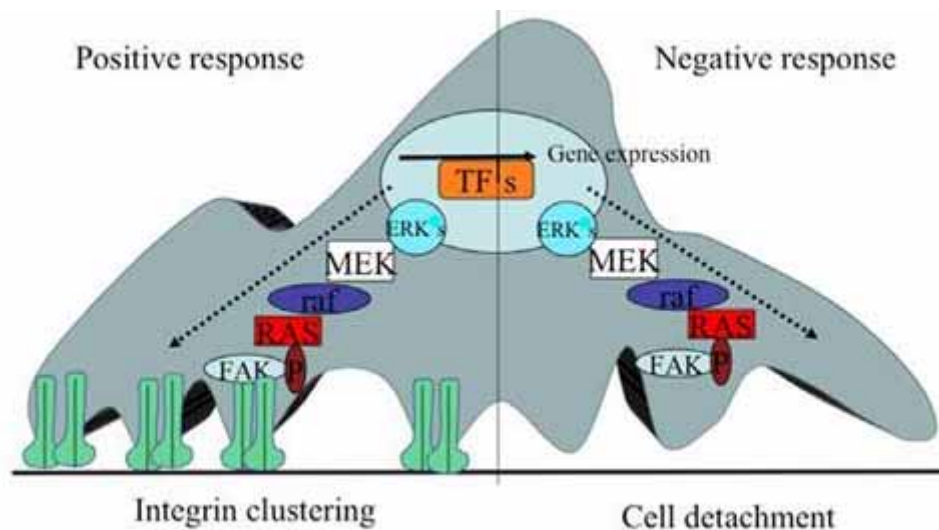


Figure 5.14 Représentation de l'interaction cellule-support [17]

Quand une cellule vient au contact de la surface du support, il se forme des contacts focaux. On pense que les intégrines des contacts focaux relaient des signaux vers le noyau (Figure 5.14). Si les signaux sont positifs, les intégrines forment des groupements qui augmentent la surface d'adhérence de la cellule au support. Si les signaux sont négatifs, alors des MMP sont produites pour détacher les

intégrines du support, diminuant ainsi la surface d'attachement de la cellule au support. Si le support ne convient vraiment pas, alors la cellule se détache totalement.

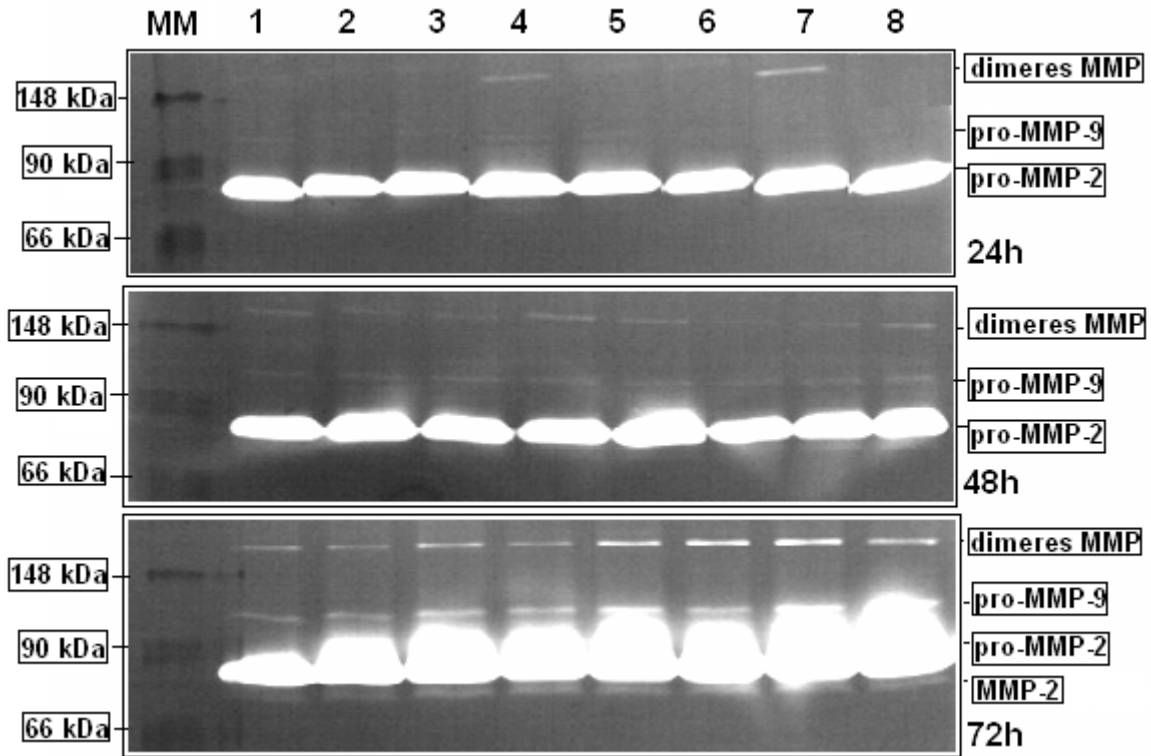
Ainsi, par le clivage des récepteurs de surface cellulaire, les MMP sont capables d'induire une interruption de l'adhérence cellule-cellule ou l'adhérence cellule-MEC et de libérer d'autres protéases (MMP-2) liées sur la surface cellulaire. La régulation des MMP est produite non seulement au niveau transcriptionnelle mais aussi après leur sécrétion par une grande diversité de cellules (fibroblastes, ostéoblastes, cellules musculaires, macrophages) par l'activation protéolytique des proMMP (enzymes inactives) ou l'inhibition des MMP activée par les inhibiteurs spécifiques TIMP (tissue inhibitors of matrix metalloproteinases).

Dans notre étude, le niveau de l'activité enzymatique spécifique des MMP sécrétés dans le milieu de culture a été analysé en utilisant la zymographie sur gélatine à intervalles de temps réguliers : 24h, 48h, 72h. Cette méthode permet la différenciation des MMP à activité gélatinolytique sur la base de masses moléculaires et la visualisation des bandes de la lyse. A ces bandes de lyse peuvent participer les formes actives mais également les formes latentes de MMP, et aussi les MMP qui sont inactives par leurs inhibiteurs TIMP.

Au contraire de la MMP-2 qui est exprimée par la grande majorité de types cellulaires, la MMP-9, identifiée dans un premier temps comme un produit de sécrétion de neutrophiles polymorphonucléaires, peut être synthétisée dans certains types cellulaires. La présence des bandes lytiques supérieures à 96 kDa peut être expliquée comme la capacité de MMP à former des polymères en établissant des liaisons disulfure entre les chaînes de cystéine libre. La MMP-9 joue un rôle important dans la migration cellulaire, elle est responsable de la formation de tumeurs et de métastases, de la cicatrisation des blessures et de l'apoptose, de l'interruption du contact entre les cellules et le support, du rejet d'implant par l'organisme.

La Figure 5.15 montre qu'après 24 et 48 heures de culture, il n'existe pas de différences considérables entre les profils d'expression de proMMP-2 du contrôle et des échantillons de titane, et qu'on trouve une induction de l'activité spécifique de proMMP-9 et des dimères MMP. Après 72 heures en culture, les fibroblastes gingivaux cultivés sur les substrats de titane non traités T1200 et T4000 et sur les films de TiO<sub>2</sub> déposés sur titane montrent une augmentation des activités gélanolytiques des enzymes proMMP-2, proMMP-9 et des dimères MMP, et l'apparition d'une bande gélatinolytique supplémentaire correspondant à la forme MMP-2 active (~ 64 kDa). Par rapport au contrôle, les cultures sur échantillons de titane montrent une stimulation de l'activité enzymatique de proMMP-2, proMMP-9 et dimères MMP, la plus forte étant enregistrée pour les supports de titane pur T1200 et T4000. Ce comportement indique que l'intégration *in vivo* de ces implants est plus difficile que celle des surfaces de titane recouvertes d'oxyde de titane. Les tests ont montré que les fibroblastes préfèrent les surfaces les plus lisses mais l'implantation *in vivo* d'une telle surface peut, au bout d'un certain temps, déclencher une activité importante des MMP et aboutir au rejet de l'implant.

Pour les supports recouverts de TiO<sub>2</sub>, la plus faible activité des MMP est manifestée par les fibroblastes cultivés sur l'échantillon T9. Il semble que cette surface combine l'effet d'induction d'une faible activité de dégradation de la MEC, qui se traduit par une probabilité faible de rejet de l'implant, avec la préférence des fibroblastes pour les surfaces lisses et modérément hydrophiles.



**Fig. 5.15** Zymogrammes d'activité protéolytique des MMP sécrétés par les fibroblastes gingivaux humains dans le milieu de culture à différentes périodes de temps (24 h, 48 h et 72 h) de maintien en contact avec le support en plastique (contrôle), les échantillons de Ti non revêtus et revêtus de TiO<sub>2</sub>. Signification des chiffres : 1, contrôle ; 2, T9 ; 3, T12 ; 4, T13 ; 5, T14 ; 6, T15 ; 7, T1200 ; 8, T4000 ; MM, marqueur de masse moléculaire.

De tous les échantillons, T1200 a les plus forts niveaux de MMP-2 active, de proMMP-9 et de dimère MMP. De ce point de vue, cette surface est donc la moins biocompatible. L'ordre d'activité croissante des MMP est : contrôle < T9 < T13 < T12 < T15 < T14 < T4000 < T1200.

On remarque dans ce classement que T13, T15 et T14 correspondent à des films d'oxyde très hydrophiles et de morphologie transverse colonnaire, et que la rugosité, forte, diminue quand on passe de T13 à T15 et à T14. L'échantillon T9 correspond à un film modérément hydrophile, peu rugueux et de morphologie compacte. L'échantillon T12, intercalé entre T13 et T15, a en commun avec T9 la rugosité faible et la morphologie compacte mais, comme T13, T15 et T14, il est très hydrophile. Il semble donc, mais il faut être prudent compte tenu du petit nombre d'échantillons, que deux combinaisons des caractéristiques de surface conduisent à une faible activité des MMP : (rugosité faible + mouillabilité modérée + morphologie transverse compacte) ou (rugosité forte + mouillabilité forte + morphologie transverse colonnaire).

### 5.3. Etude de l'interaction des ostéoblastes avec les dépôts de TiO<sub>2</sub>

Les cultures d'ostéoblastes ont été réalisées quelques mois après celles des fibroblastes. Les échantillons ont été choisis plus rugueux que pour les fibroblastes, pour tenir compte du fait qu'il a été montré que les ostéoblastes préfèrent les surfaces rugueuses. Les échantillons retenus sont :

- **un échantillon de titane pur**, poli 4000, recouvert uniquement de l'oxyde qui se forme naturellement lors de l'exposition à l'air ;
- **des échantillons de titane revêtus de TiO<sub>2</sub> par MOCVD**, qui diffèrent par la rugosité, l'épaisseur, la mouillabilité, la composition allotropique et la morphologie transversale du film d'oxyde ;
- **un échantillon de titane revêtu de TiO<sub>2</sub> par anodisation** ;
- **boîte de culture** en plastique (contrôle).

Les principales caractéristiques des films de TiO<sub>2</sub> et des échantillons de titane utilisés pour la culture des ostéoblastes (la lignée cellulaire hFOB 1.19) sont présentées dans le Tableau 5.2. Les échantillons choisis pour ces cultures diffèrent en morphologie, rugosité et composition allotropique.

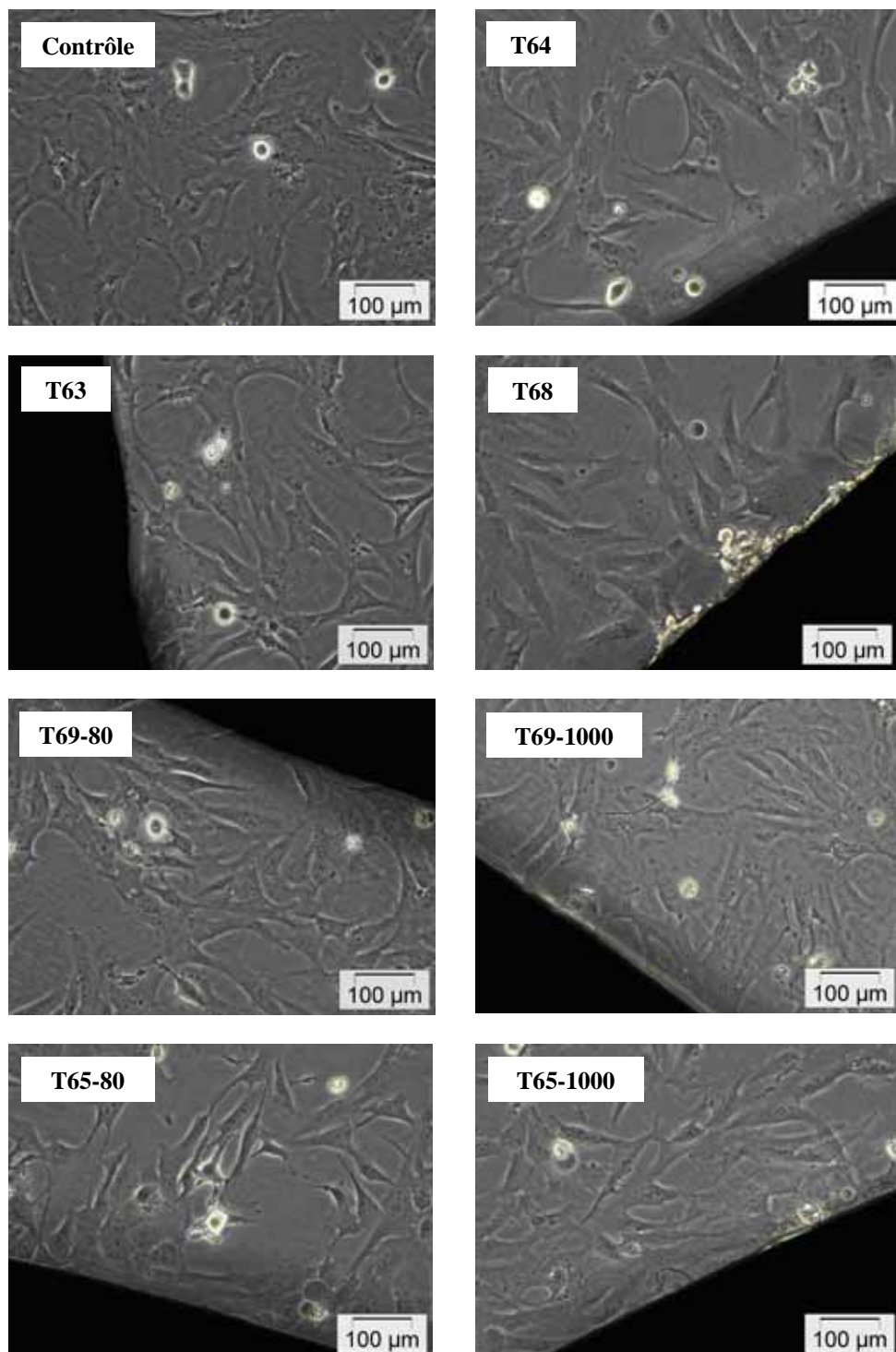
**Tableau 5.2.** Caractéristiques des échantillons utilisés pour la culture des ostéoblastes. Dans la colonne *composition allotropique*, a (r) signifie que l'anatase (le rutile) est nettement minoritaire ; ea (er) signifie que l'anatase (le rutile) est à l'état de traces, c'est-à-dire à la limite de détection par diffraction des rayons X. La mouillabilité est estimée d'après l'angle de contact  $\theta$  d'une goutte d'eau : très hydrophile,  $\theta < 10^\circ$  ; hydrophile,  $10^\circ < \theta < 35^\circ$  ; modérément hydrophile,  $35^\circ < \theta < 65^\circ$ .

code	P <sub>tot</sub> (torr)	$\chi_{\text{TTIP}}$ (x 10 <sup>-6</sup> )	poli	R <sub>a</sub> ( $\mu\text{m}$ )	épaisseur (nm)	composition allotropique	morphologie transverse	mouillabilité
T63	1	2000	4000	0,35	1400	R - ea	colonnaire	très hydrophile
T64	1	7000	4000	0.04	2000	R - ea	compacte	mod. hydrophile
T68	1-20	6000-300	4000	0,45	2000	A - R	GdC	hydrophile
T69-80	20	1035	80	2,55	1200	A - r	colonnaire	très hydrophile
T69-1000	20	1035	1000	0,4	1200	A - er	colonnaire	hydrophile
T65-80	1	4500	80	2,30	1500	A - er	compacte	mod. hydrophile
T65-1000	1	4500	1000	0,45	1500	A - r	compacte	mod. hydrophile
T-4000	-	-	4000	0,04	-	-	-	mod. hydrophile
Ti anod	-	-	4000	0,04	50	amorphe	-	mod. hydrophile

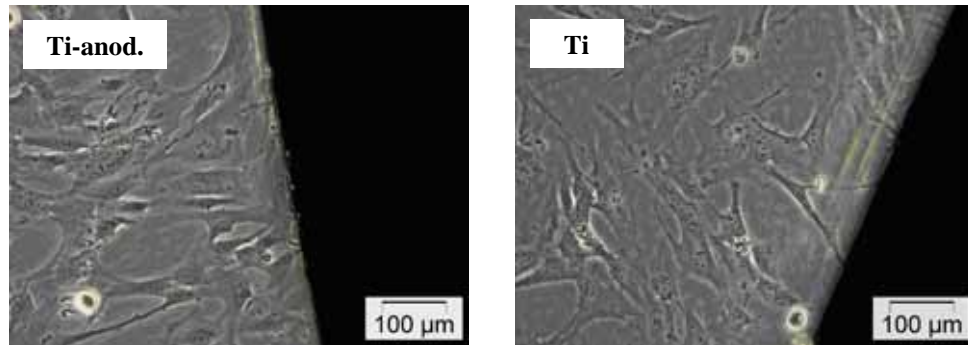
#### 5.3.1. Etude de la morphologie des ostéoblastes et du potentiel cytotoxique des dépôts de TiO<sub>2</sub>

La morphologie cellulaire a été observée par microscopie en contraste de phase, à des intervalles de 24 heures, jusqu'à ce que les cellules arrivent à confluence. La Figure 5.16 montre qu'il

n'existe pas de différences significatives de morphologie entre les cellules du contrôle et les cellules situées à proximité des échantillons à tester. Les cellules ont un aspect de fibroblastes, avec un contour polygonal au niveau de l'interaction avec le support. On voit également des cellules isolées, rondes, en cours de division ou qui viennent de se diviser.

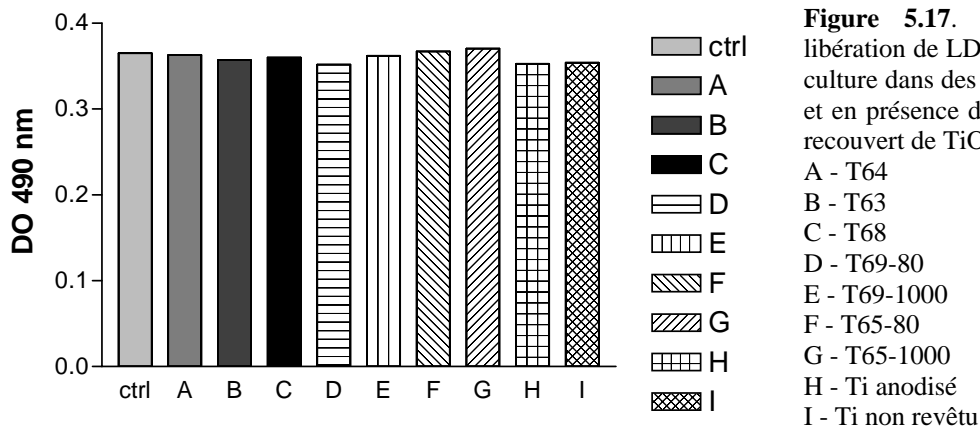






**Figure 5.16.** Morphologie visualisée au microscope à contraste de phase des ostéoblastes cultivés 48 heures : le contrôle, et le voisinage des échantillons de titane non revêtu et de titane revêtu de TiO<sub>2</sub> par MOCVD ou par oxydation anodique

Pour vérifier les éventuels effets cytotoxiques des échantillons de titane et de titane revêtu de TiO<sub>2</sub>, les échantillons ont été soumis à la détection spectrophotométrique de l'activité de la LDH libérée en cas de rupture de la membrane cellulaire. Le test a été effectué après 72 heures de mise en culture, sur neuf supports, en comparaison avec la culture 2D réalisée sur la plaque en plastique du contrôle.



D'après la Figure 5.17, par rapport au contrôle, la viabilité des cellules hFOB n'est pas affectée significativement par la présence des différents matériaux dans le milieu de culture. C'est un premier indice de la biocompatibilité des matériaux testés vis-à-vis des cellules ostéoblastes.

### 5.3.2. Détermination de la capacité d'adhérence des ostéoblastes

L'adhérence cellulaire à la matrice extracellulaire (MEC) est essentielle pour le développement, le maintien et le remodelage du tissu osseux. L'interaction adhésive avec les composantes MEC qui inclue aussi la fibronectine et le collagène type I, joue un rôle critique dans la survie, la prolifération et la différenciation des ostéoblastes, dans la minéralisation de la matrice et dans



la formation du tissu osseux [18] [19]. De plus, ces interactions sont importantes pour la fonction des ostéoclastes et la résorption du tissu osseux [20].

Du fait du rôle crucial du processus d'adhérence cellulaire par l'intermédiaire de la MEC, l'étude de protéines d'adhérence cellulaire est d'une importance majeure dans les applications biotechnologiques et biomédicales mettant en jeu la formation du tissu osseux sur des supports biocompatibles.

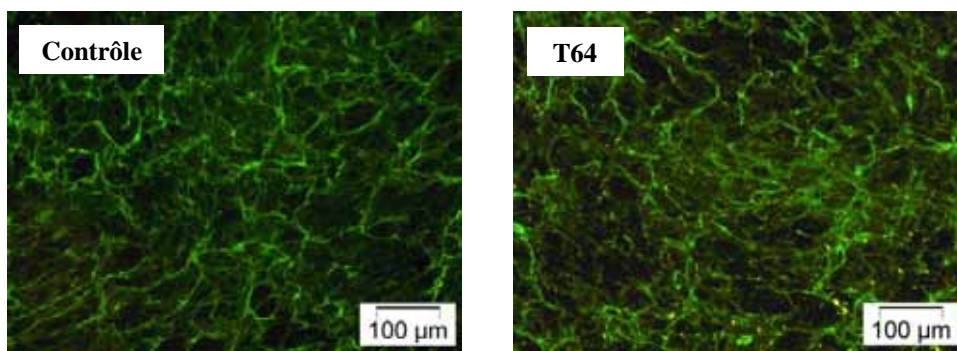
#### 5.3.2.1. Mise en évidence de la fibronectine synthétisée par les ostéoblastes

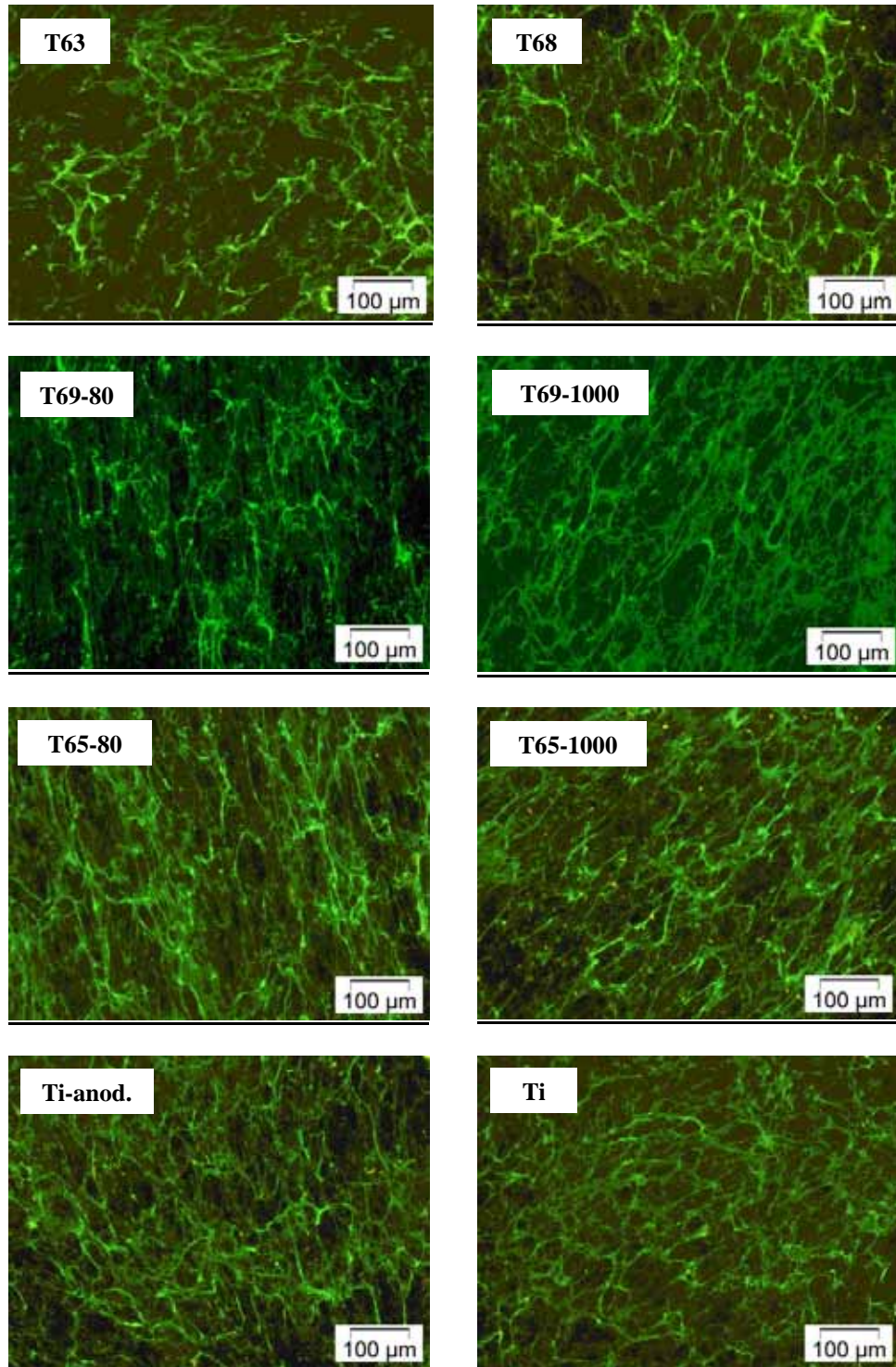
La matrice extracellulaire produite par les ostéoblastes contient la glycoprotéine nommée fibronectine (FN) impliquée dans l'adhérence et l'étalement cellulaire, l'organisation du cytosquelette et la différenciation des ostéoblastes *in vitro*. En effet l'addition de molécules antagonistes de la FN dans le milieu de culture inhibe la différenciation progressive des cellules calvariales fœtales. Les résultats présentés par Globus et al [21] suggèrent que la fibronectine et le facteur de transformation  $\text{TGF } \beta 1$  influencent la formation du tissu osseux par la régulation de la survie des ostéoblastes.

Par ailleurs, l'influence de la fibronectine sur l'adhérence cellulaire et le comportement des ostéoblastes a été mise en évidence par des cultures sur différents matériaux recouverts à l'avance par cette protéine. Ainsi, Yunzhi et al [22] étudiant l'adsorption de la FN sur le titane ont mis en évidence des différences dans l'attachement de précurseurs d'ostéoblastes sur des supports pré-recouverts soit de  $\text{TiO}_2$  soit de fibronectine adsorbée

Dans notre étude, les ostéoblastes humains fœtaux ont été cultivés sur la surface des échantillons de titane non traités et de titane recouverts d'un film d'oxyde de titane avec les caractéristiques présentées dans le Tableau 5.2. La Figure 5.18 montrent les résultats de l'évaluation de l'expression de la FN après 120 heures de culture sur les échantillons d'intérêt.

Il n'existe pas de différences significatives entre les niveaux d'expression de la FN par les cellules cultivées directement sur le plastique et sur les échantillons de Ti et de  $\text{TiO}_2/\text{Ti}$ , à l'exception de l'échantillon T63, de structure colonnaire, très hydrophile, composé presque exclusivement de rutile qui conduit au taux d'expression de fibronectine le plus faible.





**Figure 5.18.** Expression de la fibronectine par les ostéoblastes fœtaux humains cultivés sur le contrôle, du titane non revêtu, du titane anodisé, et du titane revêtu de  $\text{TiO}_2$  par MOCVD

On observe une expression forte de FN par les cellules du contrôle. Un niveau d'expression approximativement similaire est observé sur le titane non revêtu, et les échantillons T65-80, T65-1000, T69-1000 et Ti anodisé. Pour les autres échantillons traités par MOCVD (T64, T68, T69-80) et dont les dépôts d'oxydes présentent des caractéristiques assez différentes, le niveau d'expression de la

fibronectine est moyen. L'évaluation au microscope de la densité du réseau de FN permet de proposer le classement suivant du niveau d'expression de cette protéine d'adhérence :

$$\text{Contrôle} \approx \text{T4000} \approx \text{T65-80} \approx \text{T65-1000} \approx \text{T69-1000} \approx \text{Ti}_{\text{anodisé}} > \text{T64} \approx \text{T68} \approx \text{T69-80} > \text{T63}$$

**Tableau 5.3.** Les trois familles d'échantillons classées par expression décroissante de la FN.  
(H = hydrophile ; mH = modérément hydrophyle ; tH = très hydrophyle)

échantillon	mouillabilité	composition	rugosité	morphologie
contrôle	mH	plastique	-	-
T4000	mH	oxyde amorphe	0,04	compacte
T65-80	mH	A	2,30	compacte
T65-1000	mH	A – r	0,45	compacte
T69-1000	H	A	0,40	colonnaire
Ti anodisé	mH	oxyde amorphe	0,04	compacte
T64	mH	<b>R</b>	0,04	compacte
T68	H	A – <b>R</b>	0,45	GdC – colonn.
T69-80	<b>tH</b>	A – r	2,55	colonnaire
T63	<b>tH</b>	<b>R</b>	0,35	colonnaire

Le Tableau 5.3 présente les trois familles d'échantillons mises en évidence en classant l'activité d'expression de la FN, en regard des caractéristiques de la couche d'oxyde correspondante. Il apparaît clairement que la rugosité et la morphologie ne sont pas des paramètres déterminants du classement. Par contre, on observe que l'échantillon le moins performant, T63, est à la fois très hydrophile et très riche en rutile. On observe également que les échantillons moyennement performants sont soit riche (T68) ou très riche (T64) en rutile ou très hydrophile (T69-80). Enfin, les échantillons performants contiennent peu (T65-1000) ou pas de rutile (T65-80, T69-1000) et/ou sont hydrophile (T69-1000) ou modérément hydrophiles (T4000, T65-80, T65-1000, Ti anodisé). Les facteurs déterminants sont donc la mouillabilité et la composition allotropique : d'après le test d'expression de la FN, une teneur élevée en rutile et une forte mouillabilité ( $\theta < 10^\circ$ ) défavorisent l'adhérence. A l'inverse, une teneur élevée en anatase et des angles de contact de quelques dizaines de degrés favorisent l'adhérence.

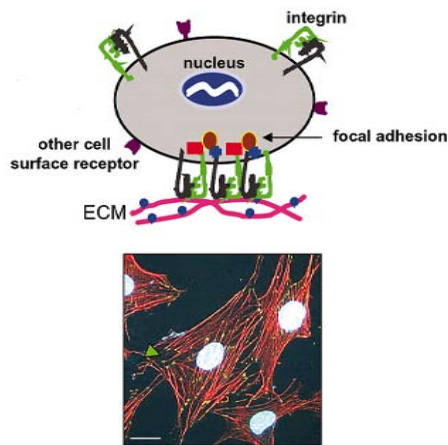
L'énergie de surface ou la mouillabilité est un paramètre d'intérêt particulier dans les applications biomédicales qui impliquent les interactions cellule-biomatériau. Le phénomène de mouillabilité affecte l'absorption des protéines, l'adhérence, la distribution et la prolifération cellulaire. Les cellules se fixent et s'étalent plus facilement sur des surfaces ayant une grande énergie de surface mais on trouve également l'opinion contraire suivant laquelle l'adhérence cellulaire est favorisée par les surfaces hydrophobes [23]. De plus, la mouillabilité influence très fortement la conformation des molécules de FN adsorbées sur la surface et les interactions cellule-MEC [24].

Une autre caractéristique de surface qui influence l'adhérence cellulaire et la formation du réseau de FN est la rugosité [25]. D'après Martin et al., la production de FN et d'autres protéines donne de meilleurs résultats sur des surfaces rugueuses [26]. Dans nos études, les surfaces les plus rugueuses ( $R_a > 2$ ) sont celles des échantillons T65-80 (dont la surface est modérément hydrophile) et T69-80 (dont la surface est hydrophile). Ces deux échantillons manifestent des expressions différentes

de la FN : expression maximale sur T65-80, intermédiaire sur T69-80. Il semble donc que, pour les ostéoblastes, la distribution de la FN sur le substrat n'est pas modulée par la rugosité. Des surfaces très lisses (comme T4000, Ti anodisé, T4000) conduisent, elles aussi, à un niveau maximal de fibronectine. Par conséquent, la mouillabilité et la composition allotropique sont probablement les deux paramètres principaux qui influencent l'adhérence des ostéoblastes et implicitement l'expression de la FN sur les échantillons étudiés.

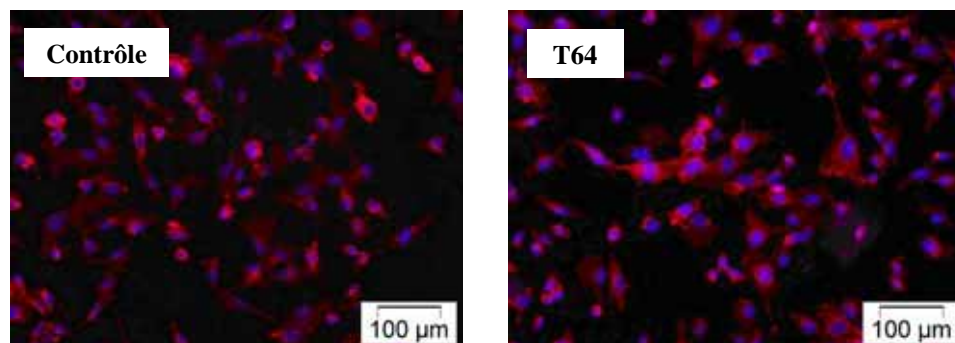
### 5.3.2.2. Mise en évidence de l'intégrine $\beta 1$

L'attachement des intégrines aux composantes de la MEC (par exemple la fibronectine, le collagène de type I, les sialoprotéines osseuses et l'ostéopontine avec séquence RGD) facilite le processus d'adhérence cellulaire. Ultérieurement, les intégrines s'associent rapidement au cytosquelette de l'actine et forment les contacts focaux qui contiennent des molécules de structure et de signalisation [27, 28]. Ainsi sont activées les voies de signalisation impliquées dans la survie des ostéoblastes, la progression du cycle cellulaire, l'expression génique et la minéralisation de la matrice [18]. Plusieurs cascades de signalisation activées par les intégrines sont impliquées dans la différenciation des ostéoblastes [29, 30]. La Figure 5.19 montre le rôle des intégrines dans la formation des contacts focaux.

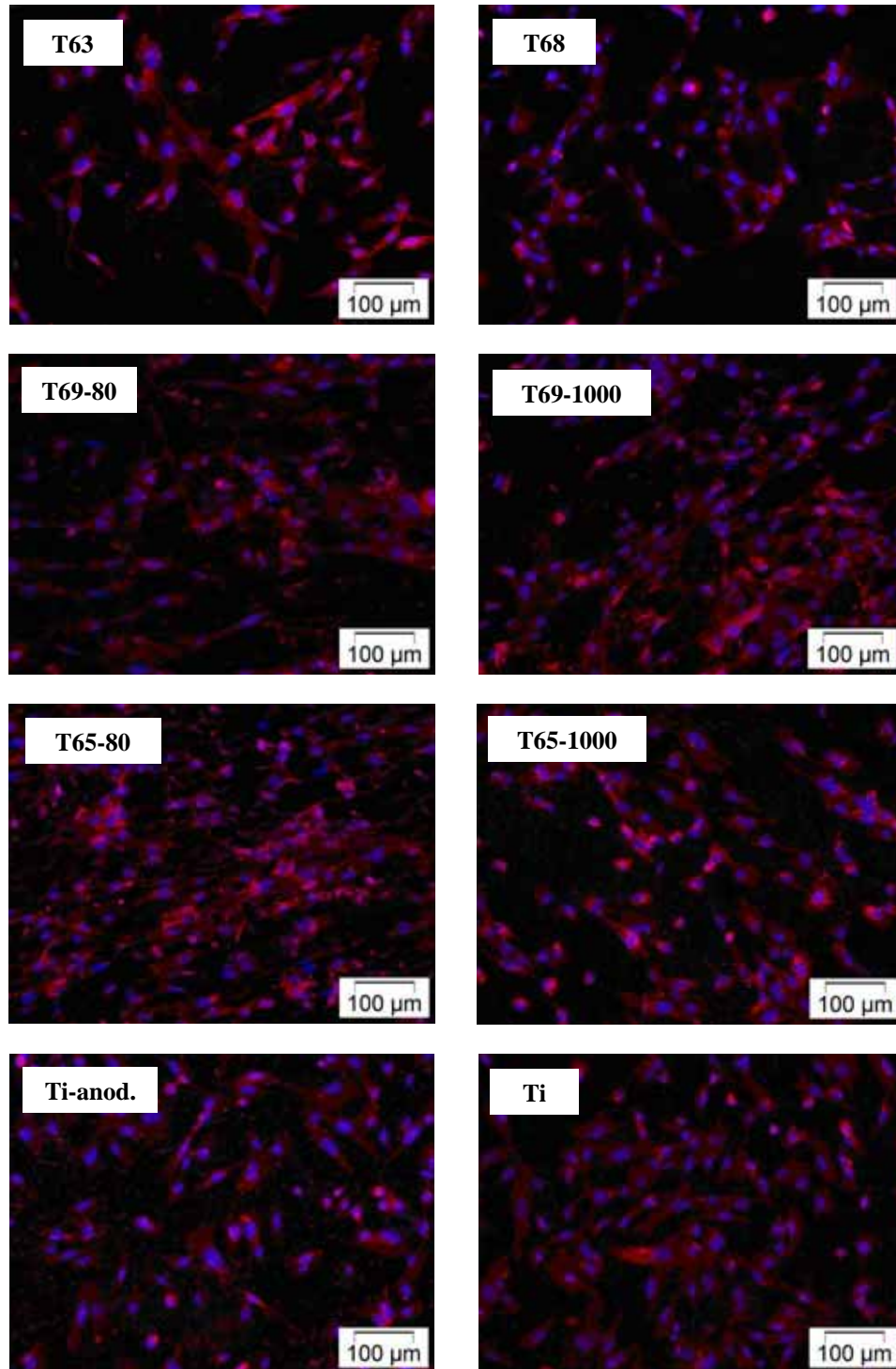


**Figure 5.19.** L'adhérence cellulaire à la MEC, implique l'association des intégrines à des composants de la MEC et leur clusterisation conduisant à la formation des contacts focaux (des ensembles supramoléculaires contenant des composantes structurales et de signalisation). La photographie montre la détection par immunofluorescence des fibres de stress (rouge) dans des ostéoblastes qui adhèrent à la FN (ADN en blanc) [18]

L'expression de l'intégrine  $\beta 1$  par les ostéoblastes a été étudiée sur les cultures d'ostéoblastes sur les échantillons de Ti et de TiO<sub>2</sub>/Ti. Les résultats sont présentés sur la Figure 5.20.







**Figure 5.20.** Mise en évidence immunocytochimique de l'expression de la sous unité  $\beta 1$  des intégrines par les ostéoblastes fœtales humains, cultivés sur le contrôle, sur l'échantillon de titane non revêtu et sur des échantillons de titane revêtus de  $\text{TiO}_2$  par MOCVD et par oxydation anodique. L'ADN est marqué avec du DAPI.

L'évaluation qualitative de l'expression de la FN permet de proposer le classement suivant :

contrôle  $\approx$  T4000  $\approx$  T63  $\approx$  T64  $\approx$  T65-1000  $>$  T65.80  $\approx$  T69-80  $\approx$  T69.1000  $\approx$  Ti anod  $>$  T68

Ce classement est présenté dans le Tableau 5.4, en regard des caractéristiques des couches d'oxyde. Il est notablement différent du classement précédent

**Tableau 5.4.** Les trois familles d'échantillons classées par expression décroissante de l'intégrine  $\beta 1$

échantillon	mouillabilité	composition	rugosité	morphologie
contrôle	mH	plastique	-	-
T4000	mH	oxyde amorphe	0,04	-
T63	tH	R	0,35	colonnaire
T64	mH	R	0,04	compacte
T65-1000	mH	A – r	0,45	compacte
T65-80	mH	A	2,30	compacte
T69-80	tH	A – r	2,55	colonnaire
T69-1000	H	A	0,40	colonnaire
Ti anod	mH	oxyde amorphe	0,04	amorphe
T68	H	A – R	0,45	GdC – colonn.

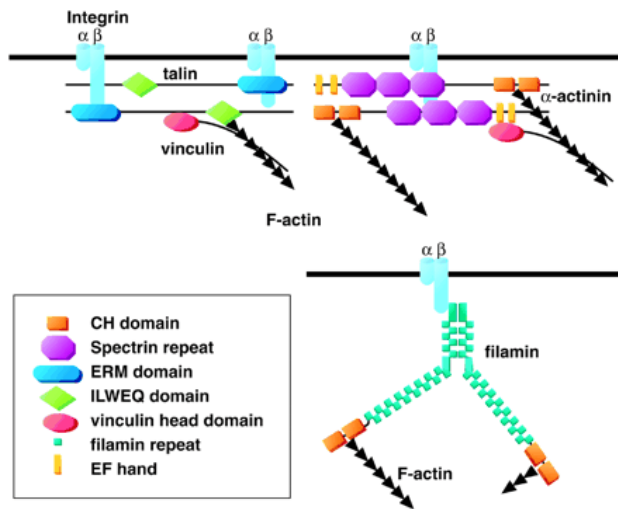
Le Tableau 5.4 présente les trois familles d'échantillons mises en évidence en classant l'activité d'expression de l'intégrine  $\beta 1$ , en regard des caractéristiques de la couche d'oxyde correspondante. Ce classement est très différent du précédent. Et, contrairement au précédent, il ne fait apparaître aucune influence marquée de l'une des caractéristiques du dépôt : en particulier, les échantillons riche (T68) ou très riches en rutile (T63 et T64) figurent dans la famille la moins performante et dans la famille la plus performante. Les aspects H, mH et tH de la mouillabilité paraissent, comme la rugosité et la morphologie transverse, distribuées aléatoirement.

Les différences par rapport au test d'expression de la fibronectine (la plus évidente concerne l'échantillon T63) peuvent être expliquées par le fait que la sous-unité  $\beta 1$  est composante des hétérodimères  $\alpha_5\beta_1$  (des récepteurs pour la fibronectine) et  $\alpha_2\beta_1$  (des récepteurs pour le collagène type I).

Nos études sur les ostéoblastes cultivés sur Ti et TiO<sub>2</sub>/Ti ont montré que :

- dans tous les cas, la fibronectine est exprimée fortement et pratiquement au même niveau dans tous les échantillons étudiés (à l'exception de l'échantillon T63). Les petites différences sont probablement plus l'effet des différences d'hydrophilicité et de composition allotropique que des différences de rugosité ;
- il existe des différences dans le niveau d'expression de l'intégrine  $\beta 1$ , mais nos observations n'ont pas permis de mettre en évidence l'influence de l'une ou l'autre des caractéristiques de la couche d'oxyde sur ces différences.

### 5.3.3. Modifications dans l'expression des quelques protéines composantes du cytosquelette des ostéoblastes



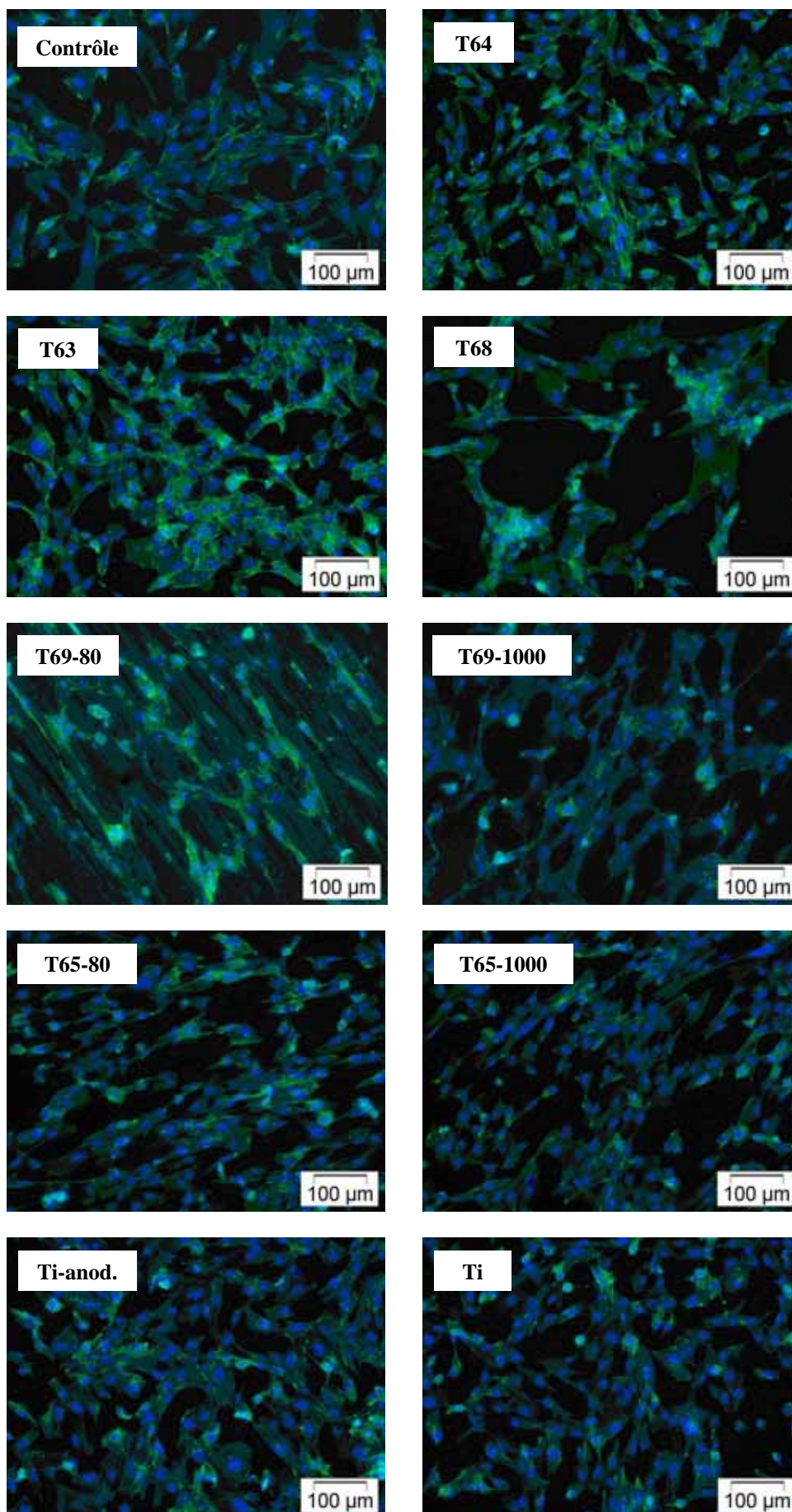
**Figure 5.21.** Modèle pour la présentation des interactions physiques entre les intégrines et l'actine F

Les interactions directes entre les terminaisons cytoplasmiques des intégrines et les protéines du cytosquelette influencent l'adhérence, l'étalement et la migration cellulaire [31]. Les intégrines lient la MEC au cytosquelette de l'actine et lui transmettent des signaux biochimiques et des informations sur la force mécanique appliquée sur la membrane plasmique. Puis, les composantes du cytosquelette permettent aux intégrines d'enclencher le processus d'adhérence cellulaire, règlent la forme des cellules et l'expression génétique.

En fait, les interactions entre la MEC et le cytosquelette cellulaire se produisent au niveau des contacts focaux, des ensembles formés de plus de 100 protéines différentes, parmi lesquelles l'actine, l'actinine, la taline et la vinculine. Les intégrines s'associent au cytosquelette au niveau de ces contacts focaux, par des interactions dynamiques dans lesquelles les composantes s'associent et se dissocient continuellement après la réception des signaux qui lient la motilité cellulaire au cycle cellulaire (Figure 5.21). Les fibres de stress formées par les filaments d'actine sont impliquées dans l'attachement au support, l'adoption d'une certaine forme et la motilité cellulaire [32].

#### 5.3.3.1. Mise en évidence de l'expression d'actine

La Figure 5.22 présente la mise en évidence d'actine F sur les échantillons revêtus d'oxyde de titane en comparaison avec le contrôle et le titane non revêtu. La densité cellulaire est mise en évidence par la coloration des noyaux au DAPI.





**Figure 5.22.** Mise en évidence immunocytochimique de l'expression de l'actine F par les ostéoblastes fœtaux humains cultivés sur des plaques en plastique (contrôle), sur du titane non revêtu, et du titane revêtu de  $\text{TiO}_2$  par anodisation et par MOCVD

Les filaments d'actine sont bien exprimés pour l'ensemble des échantillons, mais un peu moins fortement cependant pour les T65-80 et T68, le premier, de morphologie compacte, avec une surface rugueuse et modérément hydrophile, le second, de type GdC, avec une surface lisse et hydrophile. Les filaments d'actine sont distribués dans l'ensemble du cytoplasme et forment un réseau structural qui confère aux cellules une stabilité mécanique. L'actine est impliquée aussi dans l'adhérence, la motilité et la prolifération cellulaire. Ce marquage donne des indices sur la morphologie et la distribution des ostéoblastes présents sur les échantillons, par rapport à leur nanotopographie. Ainsi, sur les surfaces de Ti non revêtu, Ti anodisé et T64 (structure colonnaire, rutile), caractérisées par une rugosité très faible ( $R_a = 0,04 \mu\text{m}$ ) les cellules hFOB 1.19 adoptent une morphologie polygonale typique, avec des prolongations cytoplasmiques courtes et une distribution aléatoire, semblable à celle observée sur le contrôle. Sur les surfaces un peu moins lisses de T63 ( $R_a = 0,35 \mu\text{m}$ , morphologie colonnaire, rutile) et de T68 ( $R_a = 0,45 \mu\text{m}$ , morphologie GdC donc colonnaire du côté du contact avec les cellules, mélange anatase-rutile), les cellules présentent une morphologie hétérogène (cuboïde ou allongée), se distribuent au hasard et forment un réseau irrégulier avec de grandes zones sans cellules dans le cas de l'échantillon T68. Sur les surfaces des dépôts de structure compacte, composés essentiellement d'anatase mais différant par la rugosité T65-80 ( $R_a = 2,30 \mu\text{m}$ ) et T65-1000 ( $R_a = 0,45 \mu\text{m}$ ), les ostéoblastes présentent un contour polygonal allongé, avec de longs filaments qui suggèrent une adhérence forte, et tendent à former des alignements parallèles, particulièrement sur T65-80. Sur les surfaces des dépôts de structure colonnaire, composés essentiellement d'anatase eux aussi et différant par la rugosité T69-80 ( $R_a = 2,55 \mu\text{m}$ ) et T69-1000 ( $R_a = 0,40 \mu\text{m}$ ), les cellules sont allongées et forment des boucles alignées, particulièrement sur T69-80.

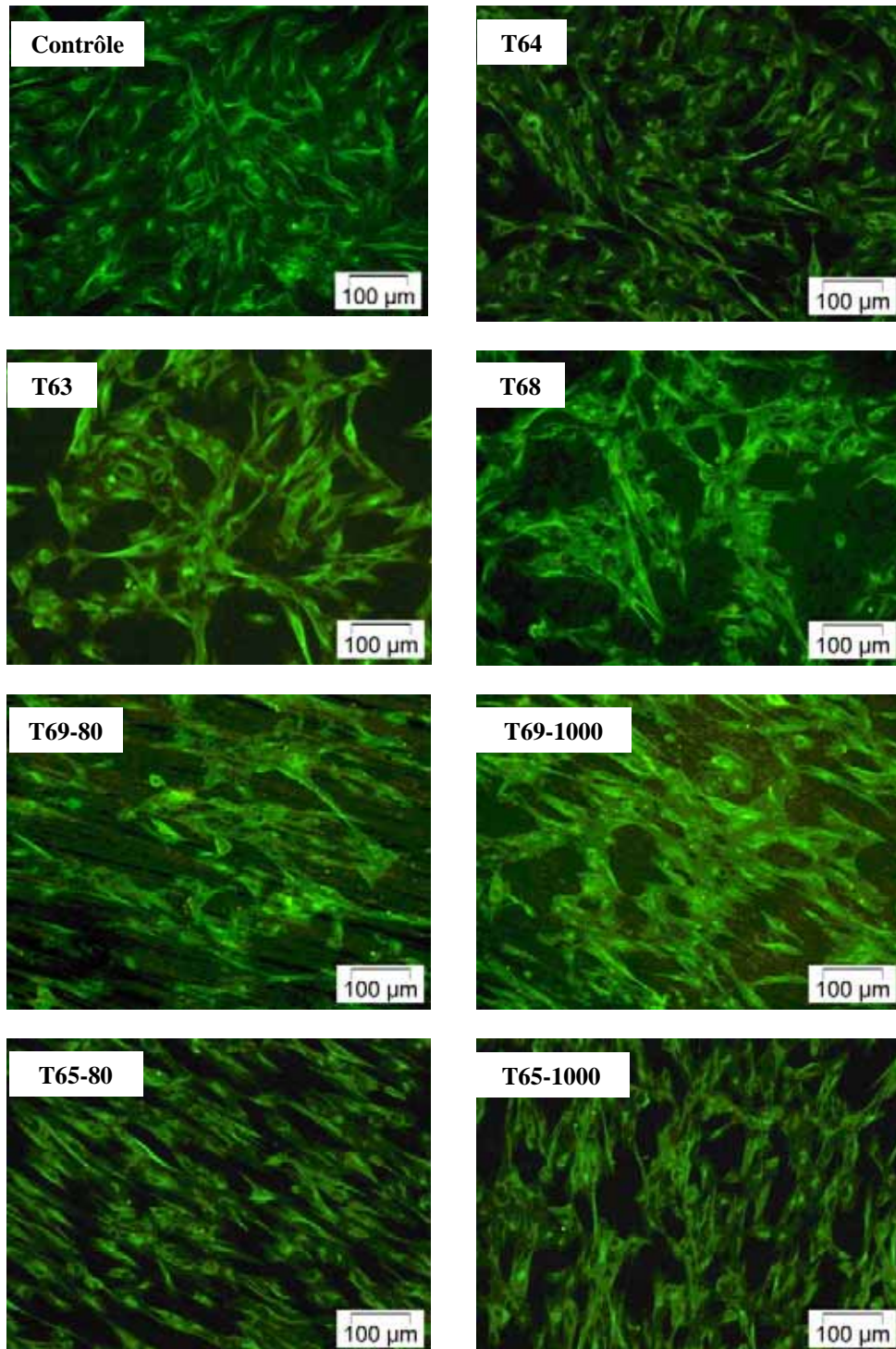
Les images obtenues en microscopie de fluorescence, ne nous permettent pas de faire une classification des échantillons suivant leur influence sur l'organisation des filaments d'actine. On peut cependant affirmer que les substrats n'affectent pas considérablement le niveau d'expression des molécules d'actine. Il semble également, qu'à côté du facteur rugosité, la structure colonnaire ou compacte du dépôt et sa composition allotropique influent bien sur la morphologie et l'organisation des cellules hFOB 1.19 sur les surfaces étudiées. Le petit nombre d'échantillons ne permet de dégager une formulation précise de ces influences.

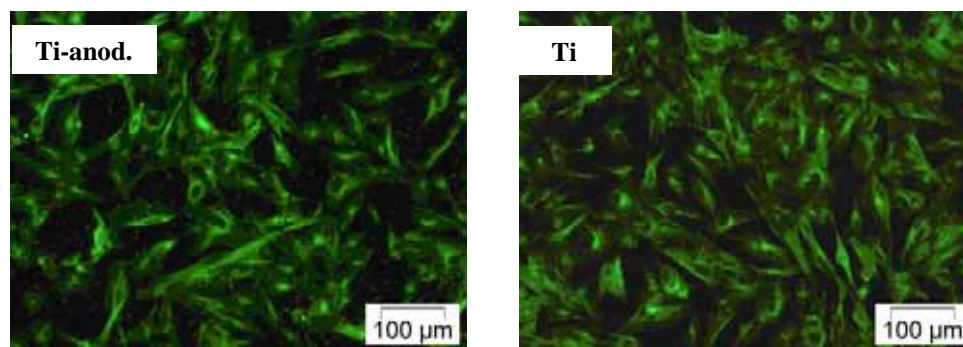
#### 5.3.3.2. Mise en évidence de l'expression de la tubuline $\alpha$

La Figure 5.23 présente l'expression de la tubuline  $\alpha$  par les ostéoblastes cultivés sur les échantillons d'intérêt. On constate une expression approximativement similaire de cette protéine micro

tubulaire sur l'ensemble des échantillons, avec une localisation cytoplasmique hétérogène. La plupart des ostéoblastes expriment la tubuline  $\alpha$  autour des noyaux ou dans les prolongations cytoplasmiques. C'est un indice de la participation de la tubuline  $\alpha$  à la division cellulaire et à la motilité cellulaire.

Les clichés de la Figure 5.23 montrent, de manière évidente, que les caractéristiques morphologiques et nanotopographiques de la surface agissent sur l'orientation des cellules hFOB 1.19.





**Figure 5.23.** Mise en évidence immunocytochimique de l'expression de la tubuline  $\alpha$  par les ostéoblastes fœtaux humains cultivés sur le contrôle, sur Ti non revêtu, Ti anodisé et Ti revêtu de  $\text{TiO}_2$  par MOCVD

Les résultats puisés dans la littérature spécialisée dans le comportement des cellules de type ostéoblaste sur des surfaces de rugosités différentes sont souvent contradictoires. Les différences constatées sur des surfaces présentant des nano-topographies différentes viennent de l'origine des cellules utilisées pour l'étude : des cultures primaires [33] des lignées cellulaires dérivées d'ostéosarcome [34]. Notre étude a utilisé des ostéoblastes fœtaux. Il est très important de comparer les conclusions des études *in vitro* sur le comportement des ostéoblastes cultivés sur des surfaces avec différentes topographies, car il n'existe pas de consensus sur la représentation topographique de la surface d'un implant [35]. La plupart des recherche sur l'influence de la rugosité ont évalué le comportement des ostéoblastes sur des surfaces micro-structurées [36, 37] mais des études ultérieures [38, 39] ont mis en évidence qu'à coté de la microtopographie, les cellules utilisent la nanotopographie du substrat pour s'orienter et migrer [40]. La pertinence des premières études (macrostructure) sur le comportement des ostéoblastes *in vivo* reste à discuter parce que les structures d'adhérence *in vivo* (par exemple l'intégrine au niveau de la membrane cellulaire) ont des dimensions à l'échelle nanométrique [41]. Il est généralement accepté que les différents types cellulaires vont s'aligner le long des défauts inscrits sur les substrats [42], un phénomène connu sous le terme de *contact guidance* (contact guidé).

Les études qui se réfèrent à l'expression des protéines du cytosquelette par les ostéoblastes fœtaux humains hFOB 1.19 cultivés sur les différentes surfaces ont conduit aux observations suivantes :

- pour tous les échantillons les marquages révélant l'actine et la tubuline  $\alpha$  sont similaires en intensité ce qui suggère que ces surfaces n'affectent pas l'organisation du cytosquelette ;
- les ostéoblastes fœtaux s'orientent et modifient leur morphologie en fonction de la morphologie et de la nano-topographie de surface du support. Ainsi, sur les surfaces les plus lisses (Ti non revêtu, Ti anodisé et T64), les cellules hFOB 1.19 manifestent une morphologie polygonale typique et une distribution aléatoire semblable à celle du contrôle. Un cas particulier est représenté par les surfaces lisses des échantillons T63 et T68, qui se différencient par la composition allotropique et la morphologie, et sur lesquels les cellules sont distribuées au hasard avec, par endroit, la présence

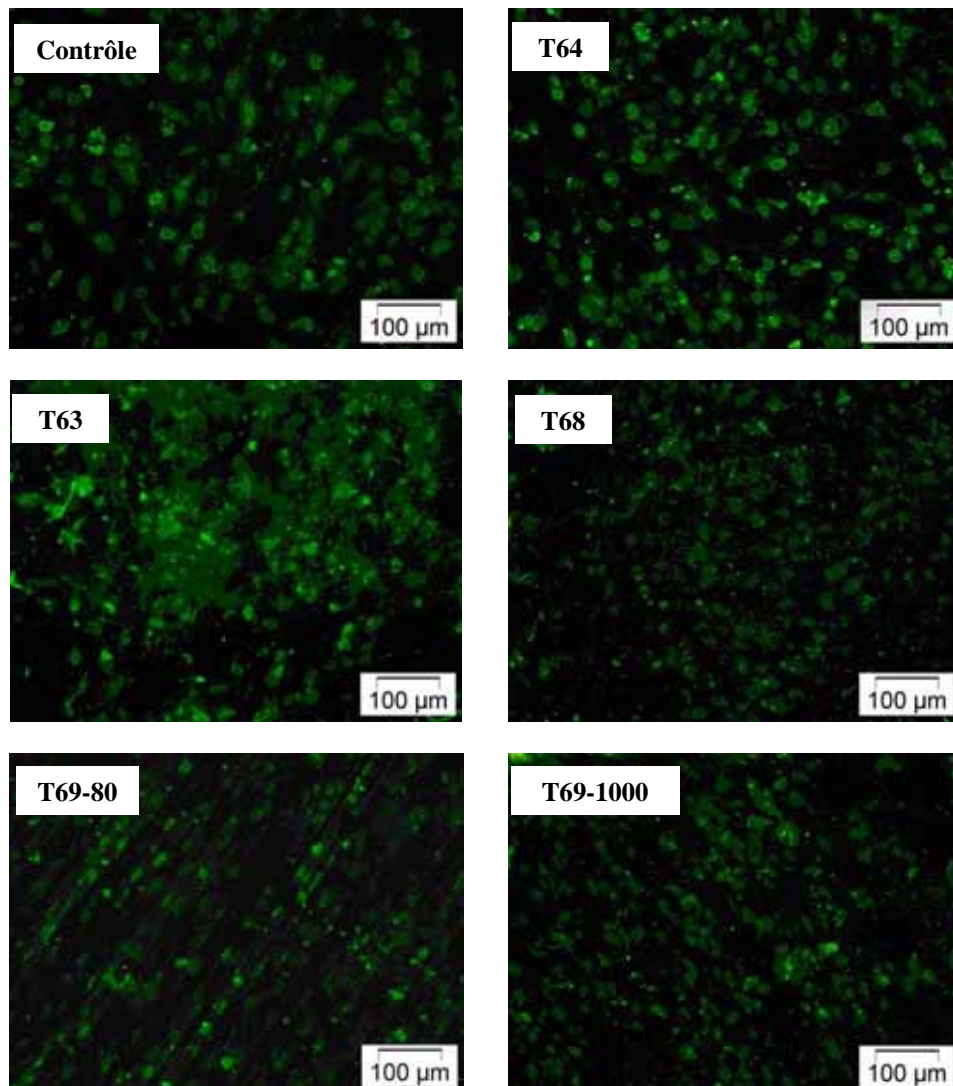
d'agglomérats cellulaires. Les ostéoblastes en contact avec les surfaces rugueuses présentent une morphologie polygonale allongée, et manifestent une orientation unidirectionnelle comme les cellules individuelles sur la surface des films à structure compacte (T65-80 et T65-1000), ou des réseaux cellulaires alignés sur la surface des films à structure colonnaire (T69-80 et T69-1000).

#### 5.3.4. Le potentiel prolifératif des ostéoblastes

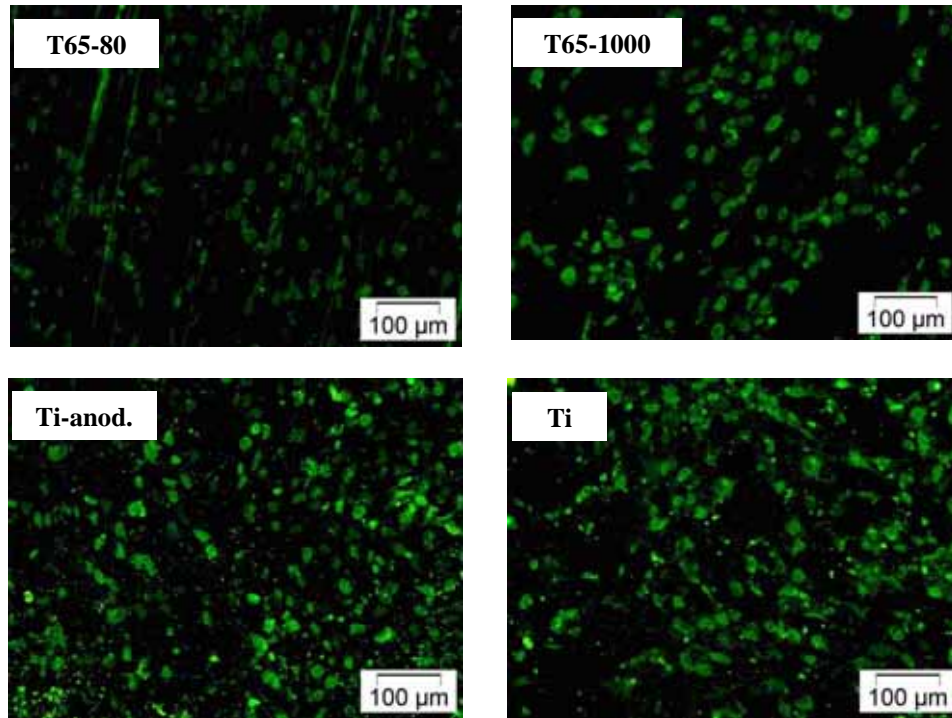
Le potentiel prolifératif des ostéoblastes fœtaux humains cultivés sur les différents échantillons a été étudié par la détection immunocytochimique du BrdU incorporé et par la mise en évidence des marqueurs de prolifération : PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) et Ki67.

##### 5.3.4.1. Test de détection du BrdU

La Figure 5.24 présente les résultats de la détection du BrdU incorporé dans l'ADN des ostéoblastes cultivés sur le support en plastique du contrôle, sur du titane non traité, et sur les sept échantillons de titane revêtu de TiO<sub>2</sub> par MOCVD ou anodisation.







**Figure 5.24.** Détection par immunofluorescence du BrdU incorporé pendant la synthèse de l'ADN par les ostéoblastes humains cultivés sur le contrôle, sur Ti non revêtu, sur Ti recouvert de  $TiO_2$  par anodisation ou par MOCVD

Si on fait une classification de la qualité de prolifération, celle ci diminue dans l'ordre :

$$T65-1000 \approx T_{anod} \approx T4000 > T64 \approx \text{contrôle} > T63 > T65-80 > T69-1000 > T69-80 > T68$$

Ce classement est présenté dans le Tableau 5.5 en regard des caractéristiques des substrats.

**Tableau 5.5.** Classement des échantillons par qualité de prolifération décroissante selon le test au BrdU

code	composition	Ra ( $\mu m$ )	morphologie	mouillabilité
T65-1000	A - r	0,45	compacte	mH
$T_{anod}$	oxyde amorphe	0,04	compacte	mH
T4000	oxyde amorphe	0,04	compacte	mH
T64	R	0,04	compacte	mH
contrôle	plastique	-	-	mH
T63	R	0,35	colonnaire	tH
T65-80	A	2,30	compact	mH
T69-1000	A	0,40	colonnaire	H
T69-80	A - r	2,55	colonnaire	tH
T68	A - R	0,45	GdC (colonnaire)	H

A l'exception de T65-1000 ( $Ra = 0,45$ ), les échantillons les plus rugueux ( $0,35 \leq Ra \leq 2,55$ ) correspondent aux fréquences les plus faibles de cellules qui présentent des signaux positifs dans le

noyau (des cellules qui sont donc dans la phase S du cycle). Les surfaces les plus lisses conduisent aux fréquences les plus élevées.

Cet effet néfaste de la rugosité sur la prolifération cellulaire des ostéoblastes a été mis en évidence dans d'autres études. Martin et al. [26] rapportent que la rugosité diminue la prolifération cellulaire et favorise la différenciation. Une autre étude, réalisée par Linez-Bataillon et al. [43] sur des ostéoblastes de souris MC3T3-E1, établit une corrélation significative entre la rugosité et la croissance cellulaire. Les auteurs ont établi que la prolifération augmentait sur des surfaces lisses de l'alliage Ti6Al4V. Pour Ponsonnet et al. [44], il existerait un seuil de rugosité, entre 0,08 et 1  $\mu\text{m}$ , au-dessus duquel la prolifération cellulaire devient difficile. Dans nos expériences, les supports sur lesquels on observe un taux d'incorporation de BrdU égal ou supérieur à ce qu'il est sur le contrôle sont également caractérisés par des surfaces lisses : T64, T4000 et  $\text{Ti}_{\text{anod}}$ , pour lesquels  $R_a = 0,04 \mu\text{m}$ . L'échantillon T65-1000, classé dans le peloton de tête, avec une rugosité  $R_a = 0,45$ , semble donc faire exception. Le Tableau 5.5 semble indiquer que la mouillabilité joue également un rôle qui pourrait expliquer la position de T65-1000.

La mouillabilité également a une influence sur la prolifération cellulaire : généralement la prolifération augmente avec la mouillabilité. Nos résultats montrent que les surfaces modérément hydrophiles, T65-1000,  $\text{Ti}_{\text{anod}}$ , T4000 et T64 favorisent davantage la prolifération que les surfaces hydrophiles et très hydrophiles, à l'exception de T65-80, modérément hydrophile, mais fortement rugueux.

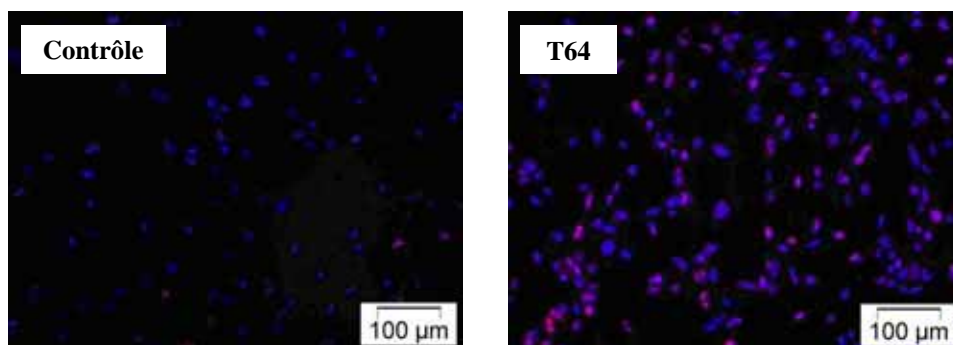
Il semble également que la morphologie colonnaire (T63, T69-1000, T69-80, T68) ait un effet négatif sur la prolifération des ostéoblastes fœtaux humains.

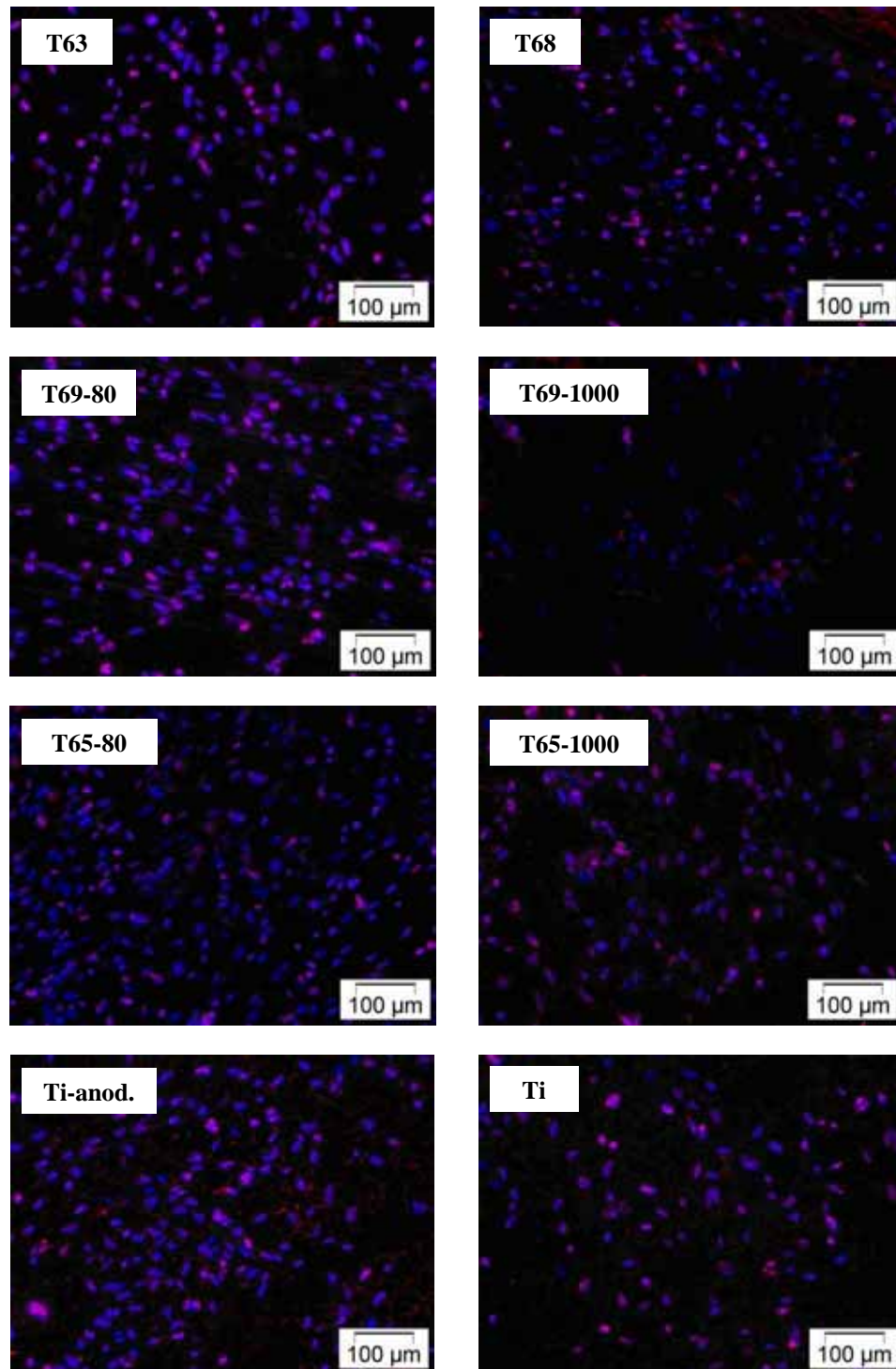
#### 5.3.4.2. Test de détection du marqueur Ki67

La Figure 5.25 présente l'étude de la prolifération cellulaire sur les mêmes échantillons par la détection par immunofluorescence du marqueur Ki67. Le classement suivant peut être proposé :

$$\text{T63} \approx \text{T68} \approx \text{T65-1000} \approx \text{T69-80} > \text{T65-80} \approx \text{T64} \approx \text{T4000} \approx \text{Ti}_{\text{anod}} > \text{T69-1000} \approx \text{contrôle}$$

Ce classement est présenté dans le Tableau 5.6 en regard des caractéristiques des couches d'oxyde.





**Figure 5.25.** La détection immunofluorescente pour la protéine Ki67 et la visualisation des noyaux (DAPI) dans les ostéoblastes humains cultivés sur de plaque en plastique, Ti non revêtu et Ti revêtu par  $\text{TiO}_2$  provenant d'anodisation et du procédé MOCVD

Tableau 5.6. Classement des échantillons par qualité de prolifération décroissante selon le test au Ki67

code	composition	Ra ( $\mu\text{m}$ )	morphologie	mouillabilité
T63	R	0,35	colonnaire	tH
T68	A - R	0,45	GdC (colonnaire)	H
T65-1000	A - r	0,45	compacte	mH
T69-80	A - r	2,55	colonnaire	tH
T65-80	A	2,30	compacte	mH
T64	R	0,04	compacte	mH
T4000	oxyde amorphe	0,04	compacte	mH
Ti anodisé	oxyde amorphe	0,04	compacte	mH
T69-1000	A	0,40	colonnaire	H
contrôle	plastique	-	-	mH

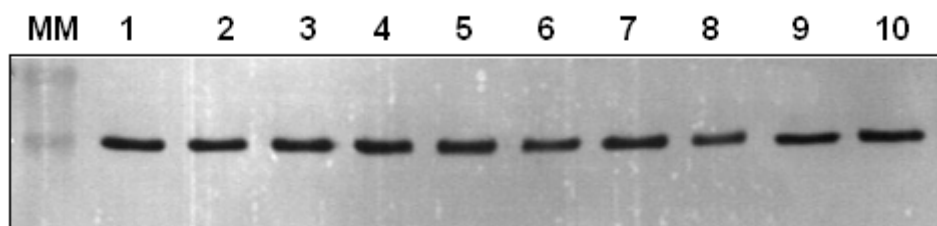
La plus faible expression est observée sur les échantillons T69-1000 (rugosité moyenne, surface hydrophile, structure colonnaire, anatase avec des traces de rutile) et sur le contrôle. Le plus grand nombre de noyaux marqués en rose (le marquage positif pour Ki67) se trouve sur les échantillons T63, T68 et T69-80 qui ont une structure colonnaire et une surface très hydrophile ou hydrophile et sur l'échantillon T65-1000 qui a une structure compacte et une surface modérément hydrophile. Un niveau intermédiaire d'expression du Ki67 est enregistré sur quatre échantillons modérément hydrophiles et de structure compacte : T65-80 est très rugueux ; les trois autres, T64, titane non traité T4000 et Ti anodisé sont très lisses ( $Ra = 0,04 \mu\text{m}$ ) et T64 ( $Ra = 0.04 \mu\text{m}$ )

Le Tableau 5.6 ne permet pas d'évaluer l'influence de la rugosité sur l'expression du marqueur de prolifération Ki67, les cellules qui montrent des signaux de fluorescence spécifiques semblables étant cultivées sur des surfaces de rugosités différentes. Cependant, nous pouvons voir que la morphologie et la mouillabilité du film de  $\text{TiO}_2$  pourraient influencer l'expression de Ki67. Ainsi, à une exception près (T65-1000, de morphologie transverse compacte) le niveau d'expression le plus élevé de l'antigène est observé sur des films de surface hydrophile et de morphologie transverse colonnaire (T63, T68, T69-80). Ces observations sont en contradiction avec celles issues du test au BrdU.

#### 5.3.4.3. Test de détection du marqueur PCNA

Les deux méthodes précédentes donnant des résultats différentes, nous avons étudié l'expression de PCNA dans les noyaux des cellules en phase S, par *western blotting*.





**Figure 5.26.** Détection de l'expression du PCNA par *western blotting* dans les lysats cellulaires des ostéoblastes humains cultivés sur plaque en plastique (contrôle), échantillon de Ti non-revêtu et les échantillons de Ti revêtus d'oxyde de titane obtenu par anodisation ou par MOCVD. La signification de chiffres : 1- contrôle, 2 – T64, 3 – T63, 4 – T68, 5 – T69-80, 6 – T69-1000, 7 – T65-80, 8 – T65-1000, 9 –  $T_{\text{anod}}$ , 10 – Ti non revêtu

Les résultats expérimentaux présentés sur la Figure 5.26 montrent des niveaux similaires d'expression de PCNA, à l'exception de deux échantillons, le T69-1000 et le T65-1000. En tenant compte du fait que la concentration en PCNA est pratiquement la même pour presque tous les supports, exceptés T65-1000 et T69-1000, pour lesquels on observe une petite diminution par rapport au contrôle et aux autres échantillons revêtus d'oxyde de titane par MOCVD, il n'est pas possible de mettre en évidence l'influence de l'une ou l'autre des caractéristiques de surface sur l'expression de PCNA. Le niveau de protéine sur T65-1000 est légèrement inférieur à celui sur T69-1000. Les deux films correspondants diffèrent par la morphologie transverse (compacte pour T65-1000, colonnaire pour T69-1000) et la mouillabilité (mH pour T65-1000 et H pour T69-1000)

Bien qu'il soit difficile d'interpréter nos résultats et d'établir une conclusion qui intègre toutes les caractéristiques de surface qui peuvent influencer la prolifération cellulaire, notre attention est attirée par le substrat T65-1000, composé d'anatase, modérément hydrophile, à la surface relativement peu rugueuse et de morphologie compacte, et auquel correspond le taux d'incorporation de BrdU le plus élevé et l'expression de Ki67 la plus forte. He et al. [45] ont cultivé des ostéoblastes de rat cultivés sur du rutile, de l'anatase et du  $\text{TiO}_2$  amorphe de même rugosité et montré que l'anatase, avec une surface modérément hydrophile (angle de contact voisin de  $60^\circ$ ), donnait un meilleur comportement cellulaire en terme d'adhésion, d'étalement, de prolifération et de différenciation cellulaires que les deux autres spécimens dont la surface était moins hydrophile (angle de contact  $> 90^\circ$ ).

### 5.3.5. Mise en évidence de l'activité des métalloprotéases de matrice

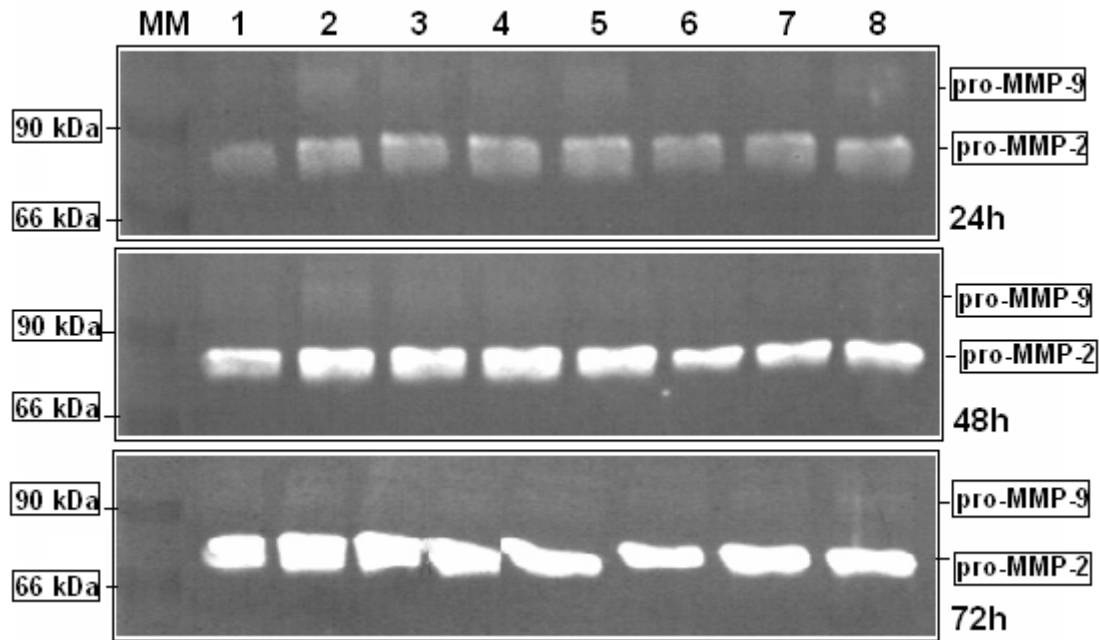
Il existe peu de données sur la remodelage de la MEC par les ostéoblastes, en présence d'un biomatériau [46, 47]. Les ostéoblastes et les ostéoclastes sont considérés comme les cellules qui jouent le rôle le plus important dans le remodelage osseux. La dégradation de la MEC est le mécanisme le plus actif qui influence l'adhésion cellulaire, la prolifération et les voies de signalisation. Ce mécanisme implique l'action des enzymes protéolytiques, en particulier les MMP [48].

Le rôle des MMP pendant la résorption osseuse n'est pas encore clair. La production de MMP par les cellules osseuses, dans les études *in vivo* et *in vitro*, suggère leur importance dans le remodelage osseux. Dans ce processus, les ostéoblastes qui produisent la collagénase (MMP-1) ont un rôle majeur dans la dégradation de la couche ostéoïde, en exposant la matrice minéralisée (qui se trouve au dessous des ostéoïdes) à l'activité ostéoclastique [49]. A coté de l'activité gélatinolytique, la MMP-9 a une activité chimiotactique vis à vis des ostéoclastes, en activant les cytokines impliquées dans la résorption osseuse. Malgré de nombreuses études réalisées sur les interactions entre les ostéoblastes et les biomatériaux, la régulation de leur activité protéolytique et du remodelage de la MEC, reste encore à clarifier.

L'une des causes les plus fréquentes de l'échec d'un implant osseux est l'apparition d'une zone d'ostéolyse à l'interface entre l'os et l'implant détruisant le contact entre eux. Ce processus résulte de la modification de la fonction des cellules présentes à ce niveau ou la conséquence de l'induction d'une réponse inflammatoire par des radicaux peroxynitrite. Quoique les ostéoblastes représentent un des premiers types cellulaires exposés aux débris du matériau implanté, les effets de ces débris n'ont pas été élucidés.

Dans ce contexte, nous avons analysé l'activité gélatinolytique spécifique des MMP exprimées dans le milieu de culture conditionné (milieu sans sérum, contenant 0,1% albumine sérique bovine, maintenu en contact avec les cellules pendant différentes durées) par les ostéoblastes, en présence de la surface du contrôle, du titane non traité et des différents échantillons de titane recouvert d'oxyde, pour différentes durées de culture cellulaire.

Oum'hamed et al [50] ont montré dans une étude sur l'influence de différents biomatériaux (titane, zircone, alumine), par *Real Time PCR*, que des cultures primaires d'ostéoblastes humains expriment les ARN messagers de MMP-2 et MMP-9. Cependant, l'analyse zymographique du milieu conditionné montre uniquement une activité gélatinolytique de la proMMP-2 qui augmente avec le temps. Les données obtenues par test ELISA ont confirmé la production de MMP2 et un très faible niveau de production de MMP-9.

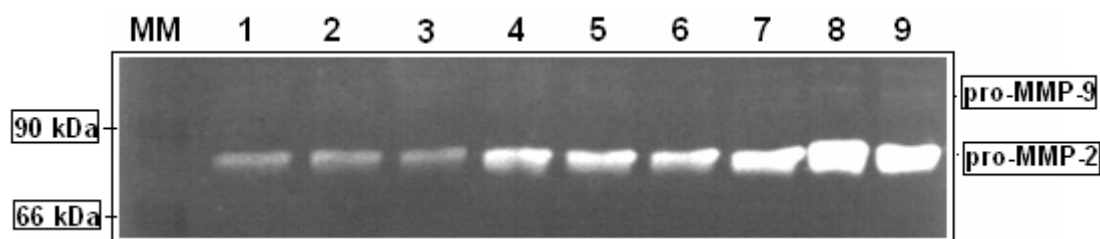


**Figure 5.27.** Zymogrammes de l'activité protéolytique des MMP secrétées par les ostéoblastes humains dans le milieu de culture sans sérum, après 24, 48 et 72 heures de contact avec les supports du contrôle, du titane non traité et du titane recouvert de TiO<sub>2</sub> : 1- contrôle ; 2 - T64 ; 3-T63 ; 4 - T68 ; 5 - T69-80 ; 6 - T69-1000 ; 7 - T65-80 ; 8 - T65-1000. MM: marqueur de masse moléculaire

L'analyse zymographique des activités gélatinolytiques spécifiques des MMP secrétées dans les milieux de cultures conditionnées par les cellules hFOB et maintenues en contact pendant 24, 48 et 72 heures avec les échantillons à tester (Figure 5.27), a mis en évidence, dans tous les cas analysés, l'expression d'une activité spécifique proMMP-2 (~72kDa) qui augmente au cours du temps. Ainsi, la Figure 5.26 montre que les activités gélatinolytiques spécifiques proMMP-2 ont été approximativement semblables à celles du contrôle pour les échantillons T69-1000, T65-1000 et T65-80. D'autre part, la bande gélatinolytique correspondant au proMMP-2 est plus marquée que celle du contrôle, dans le cas des ostéoblastes développés sur les échantillons T64, T63, T68 et T69-80, ce qui suggère une activité de dégradation de la MEC plus importante dans ces cas.

L'activité enzymatique la plus faible est manifestée par les cellules en contact avec les échantillons T69-1000 = T65-1000 < T65-80, dont le trait commun est la surface relativement rugueuse ou rugueuse.

Une faible activité gélatinolytique de la pro MMP-9 (~ 96 kDa) a été détectée sur les cellules cultivées en présence des substrats : T-64, T63, T68 et T69-80. L'induction de cette activité protéolytique confirme que ces matériaux conviennent moins pour une implantation *in vivo* que T69-1000, T65-1000 et T65-80. Il est en effet bien établi que la stimulation *in vivo* de la production de MMP par des ostéoblastes est associée à l'ostéolyse pathologique et à la perte d'asepsie des prothèses osseuses.



**Figure 5.28** Le zymogramme de l'activité gélatinolytique des MMP secrétées par les cellules hFOB dans le milieu de culture conditionné après différents temps (24h – lignes 1,2,3, 48h – lignes 4,5,6, 72h – lignes 7,8,9) de maintien en contact avec les supports du contrôle, du titane non traité et du titane oxydé par anodisation : contrôle – 1,4,7 ; Ti anodisé – 2,5,8 ; Ti non traité – 3,6,9 ; MM- marker de masse moléculaire.

La Figure 5.28 montre les profils des activités gélatinolytiques spécifiques des MMP secrétées dans le milieu de culture conditionnés par les cellules hFOB en contact avec les échantillons de titane non revêtu, et de titane anodisé. On observe une accumulation des MMP avec le temps, avec un maximum après 72 heures. La bande gélatinolytique prédominante correspond à la proenzyme MMP-2 (~72kDa). Après 24 et 48 heures de maintien en culture, on ne constate pas de différences dans les niveaux d'activité gélatinolytique de la proMMP-2 pour les trois échantillons. Mais après 72 heures, cette activité est considérablement élevée pour les ostéoblastes développés sur les deux échantillons de titane. Ce résultat est semblable à celui obtenu par Oum'hamed et al. [50] qui ont mis en évidence une stimulation de l'activité gélatinolytique spécifique de MMP-2, après 72 heures de culture en présence de substrats de titane. L'activité spécifique au proMMP-9 (~ 96 kDa) est évidente après 72 heures de maintien en culture, spécialement dans le cas des cellules en contact avec les deux échantillons de titane.

Ces résultats suggèrent que l'oxyde déposé par anodisation et l'oxyde formé naturellement sur la surface du titane seraient moins efficaces que l'oxyde déposé par MOCVD pour protéger le tissu hôte contre le rejet de l'implant. L'efficacité diminue dans l'ordre suivant :

$$T65-1000 \approx T69-1000 > T65-80 > \text{contrôle} > T68 > T69-80 > T64 \approx T63 > T4000 > \text{Ti}_{\text{anod}}$$

**Tableau 5.7.** Classement des échantillons par activité gélatinolytique croissante des MMP

code	composition	Ra (μm)	morphologie	mouillabilité
T65-1000	A - r	0,45	compacte	mH
T69-1000	A	0,40	colonnaire	H
T65-80	A	2,30	compacte	mH
contrôle	plastique	-	-	mH
T68	A - R	0,45	GdC (colonnaire)	H
T69-80	A - r	2,55	colonnaire	tH
T64	R	0,04	compacte	mH
T63	R	0,35	colonnaire	tH
T4000	amorphe	0,04	compacte	mH
Ti anodisé	amorphe	0,04	compacte	mH

La présentation des résultats dans le Tableau 5.7 montre que le schéma d'expression des MMP par les ostéoblastes est lié à la composition allotropique du film d'oxyde MOCVD sur lequel ils sont cultivés. Ainsi la plus faible dégradation de la MEC par le biais des MMP est-elle observée sur des films très riches en anatase (T69-1000 T65-80 et T65-1000), tandis que les films riches (T68) ou très riches (T64 et T63) en rutile manifestent une activité de dégradation plus forte. La mouillabilité pourrait également être un facteur favorisant l'activité de dégradation : les échantillons situés dans la partie inférieure du classement sont soit très hydrophiles (T69-80 et T63) soit modérément hydrophile (T64) ; ceci expliquerait la position de T69-80, riche en anatase mais très hydrophile. La rugosité et la morphologie de section transverse semblent sans effet.

Les résultats conduisent à la conclusion que l'échantillon de titane anodisé et l'échantillon de titane non traité par MOCVD induisent une activité de dégradation de la MEC, manifestée par les cellules hFOB, plus élevée que les échantillons revêtus de TiO<sub>2</sub>. Le fait que les films amorphes soient moins bons protecteurs contre l'activité de dégradation du contact entre l'os et l'implant que les films cristallisés déposés par MOCVD pourrait s'expliquer par le fait que ces derniers participent à la dégradation catalytique du peroxyde d'hydrogène, à la promotion de la dégradation des radicaux superoxyde et peroxynitrite impliqués dans la stimulation de la production des MMP responsables de la réduction de la MEC osseuse et de l'interruption du contact os-implant [51].

Les résultats de cette étude *in vitro* pourraient expliquer, en partie, l'amélioration des réactions du tissu osseux *in vivo*, mise en évidence par Sul [52] en utilisant des implants de titane recouvert d'une couche d'anatase de structure poreuse et épaisse de plus de 600 nm.

## Références

1. T.P. Kunzler, T. Drobek, M. Schuler, N.D. Spencer, *Systematic study of osteoblast and fibroblast response to roughness by means of surface-morphology gradients*. Biomaterials 2007. **28**: p. 2175-2182.
2. J.Y. Lim, M.C. Shaughnessy, Z. Zhou, H. Noh, E.A. Vogler, H.J. Donahue, *Surface energy effects on osteoblast spatial growth and mineralization*. Biomaterials, 2008. **29**: p. 1776-1784.
3. B. Baharloo, M. Textor, D.M. Brunette, *Substratum roughness alters the growth, area, and focal adhesions of epithelial cells, and their proximity to titanium surfaces*. Published online 27 May 2005 in Wiley InterScience ([www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)). DOI: 10.1002/jbm.a.30321, 2005.
4. A.K. Refai, M. Textor, D.M. Brunette, D. Waterfield, *Effect of titanium surface topography on macrophage activation and secretion of proinflammatory cytokines and chemokines*. Published online 7 June 2004 in Wiley InterScience ([www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)). DOI: 10.1002/jbm.a.30075, 2004.
5. K. Anselme, *Osteoblast adhesion on biomaterials*. Biomaterials, 2000. **21** p. 667-681.
6. P. van der Valk, A.W.J. van Pelt, H.J. Busscher, H.P. de Jong, C.R.H. Wildevuur, J. Arends *Interaction of fibroblasts and polymer surfaces: relationship between surface free energy and fibroblast spreading*. J Biomed Mater Res, 1983. **17**: p. 807-817.
7. J.M. Schakenraad, H.J. Busscher, C.R.H. Wildevuur, J. Arends, *The influence of substratum surface free energy on growth and spreading of human fibroblasts in the presence and absence of serum proteins*. J Biomed Mater Res, 1986: p. 773-784.
8. P.B. van Wachem, T. Beugeling, J. Feijen, A. Bantjes, J.P. Detmers, W.G. van Aken, *Interaction of cultured endothelial cells with polymeric surfaces of different wettabilities*. Biomaterials, 1985. **6**: p. 403-408.
9. K. Webb, V. Hlady, P.A. Tresco, *Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblasts attachment, spreading, and cytoskeletal organisation*. J. Biomed. Mater. Res., 1998. **241**: p. 422- 430.

10. T.W. Oates, S.C. Maller, J. West, B. Steffensen, *Human gingival fibroblast integrin subunit expression on titanium implant surfaces*. J. Periodontol, 2005. **76**: p. 1743-1750.
11. M.J. Schober, A.Y. Komarova, Y.O. Chaga, A. Akhmanova, G.G. Borisy, *Microtubule-targeting-dependent reorganization of filopodia*. Journal of Cell Science, 2007. **120**: p. 1235-1244.
12. J. Meyle, K. Gultig, M. Brich, H. Hammerle, W. Nisch, *Contact guidance of fibroblasts on biomaterial surfaces*. J Mat Sci : Mat Med 1994. **5**: p. 463-466.
13. J. Gerdes, H. Lemke, H. Baisch, H. H. Wacker, U. Schwab, H. Stein, *Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67*. J. Immunol., 1984. **133**: p. 1710-1715.
14. E. Leonardi, S. Girlando, G. Serio, F.A. Mauri, G. Perrone, S. Scampini, P. Dalla Palma, M. Barbareschi, *PCNA and Ki67 expression in breast carcinoma: correlations with clinical and biological variables*. J. Clin. Pathol, 1992. **45**: p. 416-419.
15. J. Essers, A.F. Theil, C. Baldeyron, W.A. van Cappellen, A.B. Houtsmuller, R. Kanaar, W. Vermeulen *Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair*. Mol. Cell. Biol, 2005. **25**: p. 9350-9359.
16. H. Nagase, R. Visse, G. Murphy *Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs*. Cardiovasc. Res., 2006. **69**: p. 562-573.
17. G.Rh. Owen, D.O. Meredith, I. ap Gwynn, R.G. Richards, *Focal adhesion quantification - a new assay of material biocompatibility? Review*. European Cells and Materials, 2005. **9**: p. 85-96.
18. A.J. García, C.D. Reyes, *Bio-adhesive Surfaces to Promote Osteoblast Differentiation and Bone Formation* Dent Res., 2005. **84**: p. 407-413
19. D. Zimmerman, F. Jin, P. Leboy, S. Hardy, C. Damsky, *Impaired bone formation in transgenic mice resulting from altered integrin function in osteoblasts*. Dev. Biol., 2000. **220**: p. 2-15.
20. K.P. McHugh, K.H.-D., M.H. Zheng, N. Namba, J. Lam, D. Novack, *Mice lacking beta3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts*. J Clin. Invest., 2000. **105**: p. 433-440.
21. R.K. Globus, S.B.Doty, J.C. Lull, E. Holmuhamedov, M.J. Humphries, C.H. Damsky, *Fibronectin is a survival factor for differentiated osteoblasts*. J. Cell Sci., 1998. **111**: p. 1385-1393.
22. Y. Yunzhi, R. Glover, J.L. Ong, *Fibronectin adsorption on titanium surfaces and its effect on osteoblast precursor cell attachment, colloids and surfaces*. B. Biointerfaces, 2003. **30**: p. 291-297.
23. L.C. Xua, C.A. Siedlecki, *Effectsof surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces*., Biomaterials, 2007. **28**: p. 3273-3283.
24. F. Grinnell, M. Feld, *Fibronectin adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces detected by antibody binding and analyzed during cell adhesion in serum-containing medium*. J. Biol. Chem., 1982. **257**: p. 4888-4893.
25. A.L. Rosa, M.M. Beloti, *Effect of cpTi Surface Roughness on Human Bone Marrow Cell Attachment, Proliferation, and Differentiation*. Braz Dent J 2003. **14**(1): p. 16-21.
26. J.Y. Martin, Z. Schwartz, T.W. Hummert, D.M. Schraub, J. Simpson, J.Jr. Lankford, D.D. Dean, D.L. Cochran, B.D. Boyan, *Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63)*. J Biomed Mater Res, 1995. **29**: p. 389-401.
27. S.K. Sastry, K.B., *Focal adhesions: a nexus for intracellular signaling and cytoskeletal dynamics*. Exp. Cell. Res., 2000. **261**: p. 25-36.
28. B. Geiger, A. Bershadsky, , R. Pankov, K.M. Yamada, *Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2001. **2**: p. 793-805.
29. R.K. Jaiswal, N. Jaiswal, S.P. Bruder, G. Mbalaviele, D.R. Marshak, M.F. Pittenger, *Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase*. J. Biol Chem. , 2000. **275**: p. 9645-9652.
30. G. Xiao, D.Jiang, P. Thomas, M.D. Benson, K. Guan, G. Karsenty, *MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1*. J. Biol Chem., 2000. **275**: p. 4453-4459.
31. D.A. Calderwood, S.J. Shattil, M.H. Ginsberg, *Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling*. J. Biol. Chem., 2000. **275**: p. 22607-22610.
32. S. Pellegrin, H. Mellor, *Actin stress fibres*. J.Cell Sci., 2007. **120**: p. 3491-3499.
33. M. Jayaraman, U. Meyer, M. Bühner, U. Joos, H.P. Wiesmann *Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro* Biomaterials, 2004. **25**: p. 625-631.
34. U. Meyer, A. Büchter, H.P. Wiesmann, U. Joos, D.B. Jones, *Basic reactions of osteoblasts on structured material surfaces*. Europ Cells Mat, 2005. **8**: p. 39-49.
35. L.F. Cooper, *A role for surface topography in creating and maintaining bone of titanium endosseous implants*. J Prosthet dent, 2000. **84**: p. 522-534.
36. A.S.G. Curtis, P. Clark, *The effects of topographic and mechanical properties of material son cell behaviour*. Crit Rev Biocompatibility, 1990. **5**: p. 343-362.
37. A.S.G. Curtis, C. Wilkinson, *Topographical control of cells*. Materials, 1997. **18**: p. 1573-1583.
38. M.J. Dalby, L.Di Silvio, G.W. Davies, W. Bonfield , , *Surface topography and HA filler volume effect on primary human osteoblasts in vitro*. J Mat Sci: Mater Med, 2000. **11**: p. 805-810.

39. J.H. Wang, C.H. Yao, WY Chuang, T.H. Young, *Development of biodegradable polyesterurethane membranes with different surface morphologies for the culture of osteoblasts*. J Biomed Mater Res., 2000. **15**: p. 761-770.
40. A.S.G.Curtis, Wilkinson, *Nanotechniques and approaches in biotechnology*. 19, 2001. Trends Biotechnol: p. 97-101.
41. T.J. Webster, C.E., R.H. Doremus, R.W. Siegel, R. Bizios, *Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics*. Biomaterials, 2000. **21**: p. 1803-1810.
42. J. Domke, S. Dannohl, W.J. Parak, O. Muller, W.K. Aicher, M. Radmacher, *Substrate dependent differences in morphology and elasticity of living osteoblasts investigated by atomic force microscopy*. Colloids Surf B Biointerfaces. **30**: p. 367-379.
43. P. Linez-Bataillon, F. Monchau, M. Bigerelle, H.F. Hildebrand, *In vitro MC3T3 osteoblast adhesion with respect to surface roughness of Ti6Al4V substrates* Biomolecular Engineering, 2002. **19** p. 133-141.
44. L. Ponsonnet, K. Reybier, N. Jaffrezic, V. Comte, C. Lagneau, M. Lissac, C. Martelet, *Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour*. Materials Science and Engineering C 2003. **23**: p. 551-560.
45. J. He, X. Zhou, X. Zhong, X. Zhang, P. Wan, B. Zhu, W. Chen, *The anatase phase of nanotopography titania plays an important role on osteoblast cell morphology and proliferation*. J. Mater Sci: Mater Med, 2008. **19**: p. 3465-3472.
46. N.C. Partridge, H.W. Walling, S.R. Bloch, T.H. Omura, P.T. Chan, A.T. Pearman, W.Y. Chou, *The regulation and regulatory role of collagenase in bone*. Crit. Rev. Eukaryot Gene Expr., 1996. **6**: p. 15-27.
47. K. Tezuka, K. Nemoto, Y. Tezuka, T. Sato, Y. Ikeda, M. Kobori, H. Kawashima, H. Eguchi, Y. Hakeda, M. Kumegawa, *Identification of matrix metalloproteinase 9 in rabbit osteoclasts*. J. Biol. Chem., 1994. **269**: p. 15006 -15009.
48. J.A. Lorenzo, C.C. Pilbeam, J.F. Kalinowski, M.S. Hibbs, *Production of both 92- and 72-kDa gelatinases by bone cells*. Matrix, 1992. **12**: p. 282-290.
49. R.G. Thakar, F. Ho, N.F. Huang, D. Liepmann, S.Li, *Regulation of vascular smooth muscle cells by micropatterning*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2003. **307 (4)**: p. 883-890.
50. Z. Oum'hamed, R. Garnotel, C. Josset, C. Trenteseaux, D. Laurent-Maquin, *Matrix metalloproteinases MMP-2, -9 and tissue inhibitors TIMP-1, -2 expression and secretion by primary human osteoblast cells in response to titanium, zirconia, and alumina ceramics*. J. Biomed Mater. Res. A., 2004. **68**: p. 114-122.
51. R. Suzuki, J. Muyco, J. McKittrick, J.A. Frangos, *Reactive oxygen species inhibited by titanium oxide coatings*. J Biomed Mater Res 2003. **66A**: p. 396-402.
52. Y.-T. Sul, *The significance of the surface properties of oxidized titanium to the bone response: special emphasis on potential biochemical bonding of oxidized titanium implant*. Biomaterials, 2003. **24**: p. 3893–3907.

## Conclusions générales et perspectives



## Conclusions générales et perspectives

Cette étude avait pour objectif de déposer sur du titane des films minces de  $\text{TiO}_2$  aussi variés que possible par leur composition allotropique, leur morphologie et leur état de surface, et d'évaluer leur biocompatibilité en examinant d'une part leur aptitude à protéger le substrat de titane contre la corrosion par un fluide biologique et d'autre part la capacité de leur surface à servir de structure hôte à des cellules de type fibroblaste et de type ostéoblaste.

Une large diversité de dépôts cristallisés a été préparée par la technique du dépôt chimique en phase vapeur (CVD) à basse pression (LP-CVD), en utilisant le tétra-*iso*-propoxyde de titane comme précurseur métal-organique (LP-MOCVD). L'utilisation de cette technique est bien connue pour la préparation de films de  $\text{TiO}_2$ . Par contre, quand ce travail a débuté, on ne trouvait dans la littérature que quelques travaux préliminaires sur la biocompatibilité des films de  $\text{TiO}_2$  préparés par MOVCD. Soulignons que le fait d'opérer à partir d'une phase gazeuse à basse pression permet d'obtenir des revêtements conformés à la surface, c'est-à-dire d'épaisseur constante sur toute la surface du substrat quelle qu'en soit la complexité, une propriété qui peut se révéler intéressante pour la fabrication des implants.

La diversité recherchée des propriétés structurales (rugosité, morphologie en section transverse, texture, épaisseur) et physico-chimiques (composition allotropique, charge et énergie de surface) a été effectivement obtenue en jouant sur les paramètres expérimentaux : poli initial du substrat de titane (80 – 4000), température de dépôt (300 – 600°C), pression (20 torr et 1 torr), fraction molaire du précurseur dans la phase vapeur ( $76 - 9000 \times 10^{-6}$ ), temps de dépôt.

Les films obtenus diffèrent par la teneur relative en anatase et en rutile ; il n'a pas été possible de mesurer ces teneurs par la méthode classique de diffraction des rayons X, à cause du caractère très texturé de la très grande majorité des dépôts. Les films varient également par leur rugosité ( $R_a = 0,04 \mu\text{m}$  pour les plus lisses et  $2,5 \mu\text{m}$  pour le plus rugueux). Ils présentent une morphologie transverse soit compacte, soit colonnaire, ou encore qui évolue progressivement de compacte à colonnaire à partir de l'interface  $\text{TiO}_2/\text{Ti}$  (films à gradient de compacité GdC). Ils sont soit très hydrophiles (angle de contact  $\theta < 10^\circ$ ), soit hydrophiles ( $10^\circ < \theta < 35^\circ$ ), soit modérément hydrophiles ( $35^\circ < \theta < 60^\circ$ ). L'énergie de surface varie de  $70 \text{ mJ/m}^2$  pour les plus hydrophiles à environ  $40 \text{ mJ/m}^2$  pour les moins hydrophiles. La charge de surface est négative et le point isoélectrique a été mesuré à 4,52 pour un film de structure compacte et à 4,82 pour un film de structure colonnaire.

Les observations au MEB ont montré que les dépôts obtenus sont homogènes et conformes aussi bien sur les surfaces lisses, que sur les surfaces rugueuses. Ils ne présentent ni écailles ni fissures

qui pourraient nuire à leur tenue mécanique après implantation. Leur résistance à l'arrachage, évaluée par l'épreuve du *scratch test*, s'est révélée très satisfaisante pour des échantillons de plus de 1  $\mu\text{m}$  d'épaisseur et de morphologie transverse compacte ou à gradient de compacité. Les films compacts résistent bien jusqu'à une charge de 18N, tandis que pour les films GdC, compacts dans la zone d'adhérence mais colonnaire dans la zone superficielle, les premiers signes de délamination apparaissent pour une charge de 11N. Les films de structure colonnaire commencent à se délaminer pour des charges voisines de 6 N.

Des dépôts d'oxyde de titane amorphe ont également été préparés par anodisation du titane, afin de pouvoir établir des comparaisons entre les deux familles de dépôts. Enfin, nous avons aussi utilisé des échantillons de titane non traités et donc revêtus de la seule couche d'oxyde amorphe qui se forme naturellement par exposition à l'air ambiant.

Plongés dans une solution simulant un fluide corporel (SBF), tous les échantillons testés présentent des potentiels d'électrode en circuit ouvert qui se stabilisent à -0,03 V, dans le domaine de passivation du titane. Les films déposés ne sont donc pas soumis à un processus de dissolution. La présence du dépôt de  $\text{TiO}_2$  déplace le potentiel de corrosion  $E_{\text{corr}}$  vers des valeurs plus électropositives que ceux des substrats de titane oxydés naturellement à l'air : ils améliorent donc la résistance à la corrosion. Le domaine de passivation est plus large pour le titane traité par MOCVD que pour le titane non traité ; les domaines de passivation s'étendent même sur plus de 2500 mV pour les échantillons traités par MOCVD. Aucun phénomène de *breakdown* n'a été observé pour les films de  $\text{TiO}_2$  déposés sur la surface de titane. Les films de  $\text{TiO}_2$  obtenus par MOCVD, plus particulièrement ceux obtenus sous 1 torr, ne présentent aucune réactivité jusqu'à 1,7 V. Si on considère que le potentiel dans les fluides biologiques peut atteindre au maximum 1V, on peut dire que ce comportement les rend adéquats à une utilisation clinique.

Les aspects strictement biologiques de la biocompatibilité des films de  $\text{TiO}_2$  obtenus ont été évalués *in vitro* au moyen de cultures de cellules de type fibroblaste et de type ostéoblaste et de tests pour identifier les éventuels effets cytotoxiques des films et les marqueurs spécifiques de croissance, d'adhérence et de prolifération cellulaires sur le substrat. La complexité et l'originalité de cette étude de la biocompatibilité viennent de l'évaluation de l'expression des protéines à trois niveaux: protéines extracellulaires, protéines transmembranaires et protéines cytoplasmiques. La capacité de résister à un éventuel rejet après implantation a été évaluée d'après l'activité des enzymes MMP impliqués dans la dégradation des molécules de MEC (MMP).

Des fibroblastes gingivaux ont été cultivés sur les surfaces de films préparés par MOCVD et sur celles d'échantillons de titane oxydé naturellement à l'air. Ces cultures ont tout d'abord montré, sans surprise, que les nouveaux supports créés pour le développement cellulaire ne sont pas nocifs. Les fibroblastes (FB) gingivaux cultivés présentent une morphologie normale. Ils modifient leur morphologie en fonction de la topographie de la surface du support, les surfaces rugueuses favorisant toujours l'alignement des cellules. Les tests sur les protéines d'adhésion et du cytosquelette ont montré

que, pour les échantillons revêtus de  $\text{TiO}_2$  par MOCVD, le taux d'expression de ces protéines dépend de la rugosité et de la mouillabilité : les cellules FB adhèrent mieux sur une surface lisse et modérément hydrophile plutôt que sur une surface rugueuse et très hydrophile. Il est possible que la composition allotropique et/ou la morphologie en section transverse aient également une influence sur l'adhérence, mais cette influence n'a pas pu être précisée à cause du petit nombre d'échantillons. Le potentiel prolifératif est maximal sur T9 qui est celui des dépôts MOCVD à la fois le moins rugueux (sans être lisse puisque  $R_a = 0,71 \mu\text{m}$ ) et le moins hydrophile, ainsi que sur les échantillons oxydés naturellement et dont la surface est lisse et modérément hydrophile (T1200 et T4000). Cependant, l'activité des métalloprotéases matricielles (MMP), impliquées dans la dégradation des molécules de la matrice extracellulaires et donc responsables *in fine* d'un possible rejet du substrat implanté, est plus forte sur les échantillons revêtus du seul oxyde naturel, T1200 et T4000, que sur l'ensemble des échantillons traités par MOCVD. De plus, l'activité des MMP semble être défavorisée sur les surfaces MOCVD qui combinent les critères suivants : (rugosité faible + mouillabilité modérée + morphologie transverse compacte) ; la combinaison (rugosité forte + mouillabilité forte + morphologie colonnaire) paraît également défavoriser l'activité des MMP.

Si l'on réunit l'ensemble des observations faites sur les cultures des fibroblastes gingivaux, la surface la plus indiquée est donc celle d'un oxyde de titane préparé par MOCVD, modérément rugueux et modérément hydrophile.

La culture d'ostéoblastes a mis en évidence une morphologie normale pour ce type cellulaire. Il s'est avéré difficile de trouver dans quelle mesure les paramètres qui différencient les surfaces analysées ont une influence sur l'expression des protéines d'adhérence, du cytosquelette et de la prolifération. Les résultats du test d'adhérence des ostéoblastes, avec quelques exceptions, sont satisfaisants pour toutes les surfaces. Le test d'expression de la FN semble montrer que ces petites différences sont plus l'effet de la mouillabilité et de la composition allotropique que de la rugosité ; par contre, le test d'expression de l'intégrine  $\beta 1$  n'a pas permis de mettre en évidence l'influence de l'une ou l'autre des caractéristiques de la couche d'oxyde sur ces différences. Les marquages révélant les protéines du cytosquelette sont similaires en intensité ce qui suggère que l'organisation du cytosquelette n'est pas sensible aux différences entre ces surfaces. Bien qu'il soit difficile d'interpréter les résultats touchant à la prolifération et d'établir une conclusion qui intègre toutes les caractéristiques de surface qui peuvent influencer la prolifération cellulaire, l'attention est attirée par le substrat T65-1000, composé d'anatase, modérément hydrophile, à la surface relativement peu rugueuse et de morphologie compacte, auquel correspond les taux d'incorporation de BrdU et d'expression de Ki67 les plus élevés.

Comme pour les fibroblastes, l'activité des MMP montre que l'oxyde déposé par MOCVD sera plus efficace pour protéger le tissu hôte contre le rejet de l'implant que l'oxyde formé naturellement sur la surface du titane ou qu'un oxyde déposé par anodisation. En considérant l'ensemble de ces conclusions, nous pouvons dire que la meilleure surface pour les ostéoblastes est

celle d'un film mince de  $\text{TiO}_2$  préparé par MOCVD, **modérément rugueux** et **modérément hydrophile**, avec une **morphologie transverse compacte** et **riche en anatase**. Il est intéressant de remarquer que ces conditions ne sont pas très différentes de celles qui caractérisent les surfaces les plus favorables aux fibroblastes : **modérément rugueux** et **modérément hydrophile**.

Par rapport au titane oxydé naturellement et au titane anodisé, les surfaces de  $\text{TiO}_2$  préparé par MOCVD présentent à la fois l'avantage d'une meilleure résistance à la corrosion et des propriétés de surface adéquates qui peuvent les rendre utiles dans des applications cliniques.

Ce travail confirme la capacité de la technique MOCVD à préparer des dépôts de  $\text{TiO}_2$  aux caractéristiques physico-chimiques et structurales variées. Le fait que ces caractéristiques aient une influence sur le comportement cellulaire apparaît également. Des critères liés à la rugosité, à la mouillabilité, à la composition allotropique et à la morphologie transverse ont été dégagés. Ils nécessitent d'être confirmés et affinés par une étude statistique rigoureuse, ce que n'a pas permis le petit nombre d'échantillons traités.

Ce travail confirme la capacité de la technique MOCVD à préparer des dépôts de  $\text{TiO}_2$  aux caractéristiques physico-chimiques et structurales variées. Le fait que ces caractéristiques aient une influence sur le comportement cellulaire apparaît également. Des critères liés à la rugosité, à la mouillabilité, à la composition allotropique et à la morphologie transverse ont été dégagés. Ils nécessitent d'être confirmés et affinés par une étude statistique rigoureuse, ce que n'a pas permis le petit nombre d'échantillons traités.

Les mesures d'adhérence présentées dans ce travail sont une première approche de l'étude du comportement mécanique des dépôts. Il faut les compléter par des tests de tribologie pour évaluer l'influence des frottements sur la tenue mécanique. Ces tests mécaniques doivent également être effectués en milieu simulant les fluides biologiques pour s'approcher au maximum des conditions *in vivo*.

Ce travail confirme aussi la capacité de la technique MOCVD à préparer des films d'oxyde aptes à servir d'interface entre le titane et les tissus biologiques. Cette étude mériterait d'être étendue à d'autres supports métalliques, comme les alliages de titane, moins résistants à la corrosion, ou à des alliages bio-inertes ou susceptibles de libérer des ions toxiques. Il serait également intéressant d'expérimenter des dépôts préparés sur des surfaces de forme complexe, comme peut l'être la surface d'un implant. Enfin, il serait intéressant de soumettre les dépôts préparés par MOCVD à des tests de fonctionnalisation par des protéines.

Les résultats des tests décrits dans ce travail sur les différents aspects de la biocompatibilité des dépôts de  $\text{TiO}_2$  par MOCVD ont été complétés, notamment par des tests de différenciation de cellules souches, dans une étude parallèle qui sera présentée ailleurs. Les résultats permettent d'envisager l'expérimentation *in vivo*.

## Annexe A

Tableau des expériences de dépôt de TiO<sub>2</sub> par MOCVD

Nr. exp.	Substrat/code	Type de polissage	P <sub>tot</sub> , torr	T <sub>dépôt</sub> , °C	Q <sub>vec.</sub> , sccm	Q <sub>dil.</sub> , sccm	χ <sub>TTIP</sub> · 10 <sup>-6</sup>	Durée, min	T <sub>prec</sub> , °C
1	Ti-1 Si-1	4000	20	400	20	575	1035	180	60
2	Ti-2 Si-2	4000	20	350	20	575	1035	180	60
3	Ti-3 Si-3	4000	20	350	20	575	260	180	25
4	Ti-4 Si-4	4000	20	600	75	575	260	120	25
5	Ti-5 Si-5	4000	20	300	75	575	260	180	25
6	Ti-6 Si-6	4000	20	400	20	575	76	180	25
7	Ti-7	4000	20	500	20	575	76	180	25
8	Ti-8	4000	20	600	20	575	1035	180	25
9	Ti-9	180	20	400	20	575	76	90	25
10	Ti-10	1000	20	400	20	575	76	90	25
11	Ti-11	4000	20	400	20	575	76	90	25
12	Ti-12	180	20	400	20	575	76	250	25
13	Ti-13	180	20	400	20	575	76	500	25
14	Ti-14 Si-14	180	20	400	20	575	76	360	25
15	Ti-15	180	20	400	20	575	76	430	25
16	Ti-oxy-600 Ti-oxy-500 Ti-oxy-400	4000	760	600 500 400	-	-	-	240 510 600	-
17	Ti-17 Si-17	320	20	400	17	575	76	90	28
18	Ti-18 Si-18	2400	20	400	17	575	76	90	28
19	Ti-19 Si-19	600	20	400	17	575	76	90	28
20	Ti-20 Si-20 Fe-20 Verre 20	4000 4000	20	450	20	575	76	180	25
21	Ti-21 Si-21	4000	20	350	20	575	260	180	41
22	Ti-22 Si-22	4000	20	450	20	575	260	120	41
23	Ti-23 Si-23	4000	20	600	20	575	76	180	25
24	Ti-24 Si-24	600	20	450	20	575	260	120	41

Nr. exp.	Substrat/code	Type de polissage	P <sub>tot</sub> , torr	T <sub>dépôt</sub> , °C	Q <sub>vec.</sub> , sccm	Q <sub>dil.</sub> , sccm	χ <sub>TTIP</sub> · 10 <sup>-6</sup>	Durée, min	T <sub>prec</sub> , °C
26	Ti-26 Si-26	180	20	450	20	575	260	120	41
27	Ti-27 Si-27	4000	760	350	500	5000	10 <sup>-4</sup>	60	65
28	Ti-28 Si-28	4000	760	450	500	5000	10 <sup>-4</sup>	60	65
29	Ti-29 Si-29	4000	760	550	500	5000	100	60	65
30	Ti-30 Si-30	600	760	450	500	5000	10 <sup>0</sup>	20	65
31	Ti-31 Si-31	180	760	450	500	5000	100	22	65
32	Ti-32 Si-32	4000	760	600	500	5000	100	40	65
33	Ti-33 Si-33	4000	760	450	500	5000	100	25	65
34	Ti-34 Si-34	4000	760	550	500	5000	100	23	65
35	Ti-35 Si-35	4000	760	650	500	5000	100	22	65
36	Ti-36 Si-36	4000	760	450	500	5000	100	22	65
37	Ti-37 Si-37	4000	760	350	500	5000	100	25	65
38	Ti-38	4000	20	600	-	575	-	180	-
39	Ti-39 Si-39	4000	20	600	20	575	1035	9	60
40	Ti-40 Si-40	4000	20	300	75	575	1035	180	60
41	Ti-41 Si-41	4000	20	400	20	575	5000	15	65
42	Ti-42 Si-42	4000	20	350	20	575	76	180	25
43	Ti-43 Si-43	180	20	350	20	575	76	180	25
44	Ti-44 Si-44	600	20	350	20	575	76	180	25
45	Ti-45 Si-45	4000	20	500	20	575	1035	180	60
46	Ti-46 Si-46	4000	1	400	20	300	2800	60	25
47	Ti-47 Si-47	4000	1	400	20	300	9200	35	40
49	Ti-49 Si-49	4000	20	400	20	300	1900	25	60
50	Ti-50 Si-50	4000	1	400	15	300	2000	100	25
51	Ti-51 Si-51	4000	1 2 5 10 20	400	15 15 15 15 20	300	2000	35 32 10 5 10	25 32 44 54 60
52	Ti-52-1 Ti-52-1 Si-52	4000 80	20	400	20	575	260	120	41

Nr. exp.	Substrat/code	Type de polissage	P <sub>tot</sub> , torr	T <sub>dépôt</sub> , °C	Q <sub>vec.</sub> , sccm	Q <sub>dil.</sub> , sccm	χ <sub>TTIP</sub> · 10 <sup>-6</sup>	Durée, min	T <sub>prec</sub> , °C
53	Ti-53 Si-53	4000	1	400	20	575	1068	130	25
54	Ti-54 Si-54	4000	1	400	15	575	5000	60	44
55	Ti-55 Si-55	4000	1	400	7	575	540	165	25
56	Ti-56 Si-56	4000	1	400	19	575	3200	90	35
57	Ti-57 Si-57	4000	1	400	20	575	7200	50	45
58	Ti-58 Si-58	4000	1	400	15	575	2600	120	35
59	Ti-59 Si-59	4000	1	400	25	575	9000	30	45
60	Ti-60 Si-60	4000	20	400	20	575	260	200	41
61	Ti-61 Si-61	4000	1	400	25	575	6100	60	40
62	Ti-62 Si-62	4000	1 2 5 10 20	400	25	575	6100 3000 1200 600 300	35 8 10 20 65	40
63	Ti-63 Si-63	4000	1	400	25	575	2000	90	26
64	Ti-64 Si-64	4000	1	400	25	575	7100	50	42
65	Ti-65 Si-65	80,180, 1000,4000	1	400	25	575	4500	53	36
66	Ti-66 Si-66	4000	20	500	20	575	1035	35	60
67	Ti-67 Si-67	4000	20	300	20	575	1035	210	60
68	Ti-68 Si-68	4000	1 2 5 10 20	400	25	575	6000 3100 1200 600 300	35 8 10 20 65	40
69	Ti-69 Si-69	80,180, 1000,4000	20	400	20	575	1035	45	60
70	Si-70	-	20	400	20	575	1035	60	60
71	Si-71	-	20	400	20	575	520	90	50
72	Si-72	-	20	400	20	575	520	60	50
73	Si-73	-	20	400	20	575	520	60	50
74	Si-74	-	20	400	20	575	520	60	50
75	Si-75	-	20	400	20	575	520	60	50
76	Si-76	-	20	400	20	575	520	75	50
77	Si-77	-	20	400	20	575	520	80	50
78	Ti-4000 Ti-1000 Ti-600 Ti-180 Si-78	4000,1000, 600, 180	20	400	20	575	76	360	25

Nr. exp.	Substrat/code	Type de polissage	P <sub>tot</sub> , torr	T <sub>dépôt</sub> , °C	Q <sub>vec.</sub> , sccm	Q <sub>dil.</sub> , sccm	χ <sub>TTIP</sub> · 10 <sup>-6</sup>	Durée, min	T <sub>prec</sub> , °C
79	Ti-79 Si-79	4000	20	400	20	575	76	240	25
80	Ti-80 Si-80	4000,1000, 600, 180	20	500	20	575	76	340	25
81	Ti-81 Si-8i	4000,1000 600,180	20	400	20	575	76 260 1035	240 60 60	25 41 60
82		4000,180	20	400	20	575	76	480	25
83	Si-83	-	1	400	20	575	7200	50	45
84	Si-84	-	1	400	20	575	7200	50	45



**Annexe B**

Tableau 1. Caractéristiques des échantillons utilisés pour la culture des fibroblastes gingivaux et appréciation des paramètres cellulaires exprimés

Code	Ra, μm	Rq, μm	Epaisseur nm	Composition	Morphologie	Angle de contact	LDH	Potentiel d'adhésion		Protéines de cytosquelette		Potentiel prolifératif			MMP	P.
								FN	integr. β1	actine	α - tubuline	BrdU	Ki67	PCNA		
T-9	0,71	0,89	200	A - R	compacte	55	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	25
T-12	0,75	0,92	600	a - R	compacte	9	+++	+	++	++	++	+	+	++	++	16
T-14	0,92	1,20	1000	A - R	colonnaire	8	+++	++	++	++	+	++	+	+	+	15
T-15	1,17	1,62	1100	A - R	colonnaire	7	+++	+	+	+++	++	+	+	+	++	15
T-13	1,34	1,84	1600	A - R	colonnaire	7	+++	+	+	+	++	+	+	+	++	13
Ti 4000	0,04	0,14	-	-	-	60	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	23
Ti 1200	0,35	0,40	-	-	-	60	+++	+	++	+++	++	++	++	+++	+	19
Contrôle	-	lisse	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	25

**Abréviations :**

LDH – investigation de l'intégrité cellulaire

FN – fibronectine

integr β1– intégrine

MMP – activité des enzymes MMP (+++ signifie une activité réduite, + activité forte) ; MMP – enzyme impliqué dans le détachement des cellules

P. – total des points

Tableau 2 Caractéristiques des échantillons utilisés pour la culture des ostéoblastes et appréciation des paramètres cellulaires exprimés

Code	P <sub>tot</sub> , torr	(χ) x10 <sup>-6</sup>	Ra, μm	Ep. nm	Compos	Mouillabilité	Morph.	LDH	Potentiel d'adhésion		Protéines de cytosquelette		Potentiel prolifératif			MMP	P.
									FN	Intégr β1.	actine	tubuline	BrdU	Ki67	PCNA		
T-63	1	2000	0,35	1400	R - εa	Très hydrophile	colonnaire	+++	+	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	23
T-64	1	7000	0,04	2000	R - εa	Modérément hydrophile	compacte	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	24
T-68	1-20	6000-300	0,45	2000	R - A	Hydrophile	GdC colonnaire coté culture	+++	++	+	++	+++	+	+++	+++	++	20
T-65-80	1	4500	2,30	1500	A - εr	Modérément hydrophile	compacte	+++	+++	++	++	+++	++	++	+++	+++	23
T-65-1000	1	4500	0,45	1500	A - r	Modérément hydrophile	compacte	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	26
T-69-80	20	1035	2,55	1200	A - r	Très hydrophile	colonnaire	+++	++	++	+++	+++	+	+++	+++	++	22
T-69-1000	20	1035	0,40	1200	A - r	Hydrophile	colonnaire	+++	+++	++	++	+++	++	+	++	+++	21
T- 4000	-	-	0,04	-	-	Modérément hydrophile	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+	24
Ti anod.	-	-	0,04	50	amorphe	Modérément hydrophile	lisse	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++	+	23
Contrôle	-	-	lisse	-	-	-	-	+++	++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	24

**Abréviations :**

GdC – gradient de compacité

LDH – lactate déshydrogénase (investigation de l'intégrité cellulaire)

FN – fibronectine

intégr β1– intégrine β1

Les domaines de valeurs pour l'angle de contact:

Très hydrophile : 0-10°

Hydrophile : 10 – 35°

Modérément hydrophile : 35 - 65°

---

## Liste des publications sur ces travaux

### Publications avec comité de lecture

1. **The biocompatibility of titanium in a buffer solution: compared effects of a thin film of TiO<sub>2</sub> deposited by MOCVD and of collagen deposited from a gel**  
S. Popescu, I. Demetrescu, C. Sarantopoulos, A. Gleizes, D. Iordachescu  
*Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18, 2075-2083, **2007**.
2. **Preparation and characterization of MOCVD-fabricated TiO<sub>2</sub>: thin films deposited on titanium for biomedical applications**  
S. Popescu, I. Demetrescu, A. N. Gleizes  
*Revista de Chimie (Bucuresti)*, 58(9), 880-885, **2007**.
3. **MOCVD-fabricated TiO<sub>2</sub> thin films: influence of growth conditions on fibroblast cells culture**  
**S. Popescu**, I. Demetrescu, V. Mitran, A.N. Gleizes  
*Molecular Crystals & Liquid Crystals* 483, 266-274, **2008**.

### Proceedings avec comité de lecture

1. **Various Approaches in Enhancing Biocompatibility of Metallic Implant Materials**  
S. Popescu, R. Zgiran, I. Demetrescu  
*Proceedings of 13<sup>th</sup> Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, Bucharest, Romania (RICCCE 13)*, vol. 2, p. 86-91, ISBN 97352-824-3, **2003**.
2. **Correlation between metallic materials surface preparation and biocompatibility**  
S. Popescu, A. Morega, I. Demetrescu  
*Proceedings of International Conference on Structural Analysis of Advanced Materials (ICSAM 2005)*, p. 311- 314, **2005**.

### Communications orales dans des congrès internationaux

1. **Various Approaches in Enhancing Biocompatibility of Metallic Implant Materials**  
S. Popescu, R. Zgiran, I. Demetrescu  
*13<sup>th</sup> Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (RICCCE 13)*, 16-18 Septembre **2003**, Bucarest, Roumanie.
2. **MOCVD-fabricated TiO<sub>2</sub> thin films: influence of growth conditions on fibroblast cells culture**  
S. Popescu, I. Demetrescu, V. Mitran, A.N. Gleizes  
*9<sup>th</sup> International Conferences on Frontiers of Polymers and Advanced Materials (9<sup>th</sup> ICFPAM)*, 8-12 Juillet **2007**, Cracovie, Pologne.
3. **Preparation and characterization of MOCVD-fabricated TiO<sub>2</sub>: thin films deposited on titanium for biomedical applications**  
S. Popescu, I. Demetrescu, A.N. Gleizes  
*Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (RICCCE 15)*, 22-24 Septembre **2007**, Sinaia, Roumanie.

---

### **Communications par affiche dans des congrès internationaux**

**1. Aspects of Biocompatibility of Various Thin films on Titanium Surface**

S. Popescu, D. Iordachescu, B. Popescu, D. Ionita, I. Demetrescu

*European Cell & Materials. The Cell Biomaterial Reaction (ECM V)*, 28-30 June **2004**, Davos, Suisse.

**2. Effect of MOCVD and Collagen Treatment on Titanium Biocompatibility in Buffer Solution**

S. Popescu, C. Sarantopoulos, A. Lesage, C. Grosjean, D. Iordachescu

*International Workshop of 14<sup>th</sup> Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (RICCCE 14)*, 22-24 Septembre **2005** Bucarest, Roumanie.

**3. Correlation between metallic materials surface preparation and biocompatibility**

S. Popescu, A. Morega, I. Demetrescu, International Conference on Structural Analysis of *Advanced Materials (ICSAM 2005)*, 15- 17 Septembre **2005**, Bucarest, Roumanie.

**4. The effects of titanium support roughness and nano-topography on morphology and proliferative status of human gingival fibroblasts**

A. Cîmpean, V. Mitran, S. Popescu, R. Ciubar, C. Ciofrageanu, B. Galateanu, A.N. Gleizes, D. Iordachescu

*International Congress of the [European Life Scientist Organization](#) (ELSO-2008) - Frontiers of cellular, developmental and molecular biology*, 30 Août – 2 Septembre **2008**, Nice, France

Cette thèse a été couronnée du Prix de thèse Léopold Escande 2008  
de l'Institut National Polytechnique de Toulouse.

---

## **FILMS MINCES DE DIOXYDE DE TITANE DÉPOSÉS SUR TITANE PAR MOCVD : MICROSTRUCTURE ET BIOCOMPTABILITÉ**

Des films de  $\text{TiO}_2$  variant par le teneur relative en anatase et en rutile, par la rugosité, par la mouillabilité, par la morphologie de section transverse ont été déposés sur des plaquettes de titane par MOCVD à basse pression. Du titane oxydé par anodisation ou par explosion à l'air a aussi été préparé. La capacité des dépôts à protéger le titane contre la corrosion par un fluide biologique simulé s'est avérée supérieure à celle de l'oxyde naturel. Le comportement des fibroblastes et d'ostéoblastes (morphologie, adhérence, prolifération, rejet d'implant) cultivés sur différents dépôts a été évalué par une série de tests (libération du LDH, expression de fibronectine, d'intégrine, d'actine, de tubuline, détection de BrDU, Ki67, PCNA, activité des MMP). Les observations sont discutées en fonction des caractéristiques structurales et physico-chimiques des dépôts. Schématiquement, les meilleurs résultats sont obtenus sur des surfaces modérément rugueuses et modérément hydrophiles.

## **TITANIUM DIOXYDE THIN FILMS GROWN ON TITANIUM BY MOCVD : MICROSTRUCTURE AND BIOCOMPTABILITY**

$\text{TiO}_2$  films with different relative amounts of anatase and rutile, surface roughnesses, wettabilities and cross-sectional morphologies were grown on titanium plaquettes by low-pressure MOCVD. Plaquettes of titanium oxidized by anodization and plaquettes of titanium naturally oxidized on exposition to ambient air were also prepared. The deposited oxide films were found more able to protect subjacent titanium against corrosion by a simulated body fluid than the naturally formed oxide. The behaviour of fibroblasts and osteoblasts (morphology, adhesion, proliferation, implant rejection) cultured on different films was assessed through a series of biological tests (LDH release, expression of fibronectine, integrin, actin, tubulin, detection of BrdU, Ki67, PCNA, activity of MMP's). The results are discussed in function of the structural and physico-chemical features of the films. To make it short, the best results were obtained with moderately rough and moderately hydrophilic surfaces.